

Untersuchungen zur Chromatinstruktur und DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur in menschlichen Zellen mittels ionisierender Strahlung

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines *Doctor rerum naturalium*

genehmigte

Dissertation von

Dipl. Biol. Andreas Fricke
aus Lichtenstein/Sa.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Löbrich

2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Kraft

Tag der Einreichung: 18.02.2008

Tag der mündlichen Prüfung: 29.04.2008

Darmstadt

2008

Für meine Schwester

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Löbrich, der mir als „Doktorvater“ die Möglichkeit zur Promotion eröffnete. Seine engagierte Betreuung und sein Ideenreichtum machten diese Arbeit in dieser Form erst möglich. Meinen großen Respekt verdient vor allem seine Bereitschaft, jederzeit auf alle Fragen und Vorschläge geduldig und konstruktiv einzugehen.

Mein großer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. G. Kraft von der Gesellschaft für Schwerionenforschung (GSI) in Darmstadt für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe eine Vielzahl an Experimenten durchführen zu dürfen und für die freundliche Übernahme der Zweitberichterstattung zu dieser Arbeit.

Bei Herrn Dr. M. Kühne möchte ich mich ganz herzlich für seine hilfreiche Unterstützung bei zahlreichen Experimenten, für das unermüdliche Korrekturlesen, und für sein ständiges Interesse an meiner Arbeit bedanken.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. M. Löbrich für ihre Unterstützung und die angenehmen Arbeitsbedingungen. Insbesondere möchte ich mich bei Frau S. Grudzenski und Herrn Dr. K. Gunasekara bedanken, die mir eine große Hilfe bei Experimenten an der GSI in Darmstadt waren. Für ihre Hilfsbereitschaft und logistische Unterstützung danke ich insbesondere auch Frau R. Schepp.

Auch bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. G. Taucher-Scholz, Frau Dr. S. Ritter und Frau Dr. C. Fournier, sowie bei Herrn Dr. M. Scholz von der Abteilung Biophysik der GSI in Darmstadt, die meine Experimente am UNILAC-Beschleuniger immer freundlich unterstützten und jederzeit für Fragen offen waren.

Bedanken möchte ich mich auch ganz herzlich bei der Familie von Herrn Dr. M. Kühne, die mich in den drei Jahren meiner seelischen Krise immer wieder motiviert und vorangetrieben haben und ohne die es diese Arbeit wahrscheinlich nicht gäbe.

Mein ganz besonderer Dank gilt auch meiner Familie, besonders meiner Schwester und meiner Mutter, die immer an mich geglaubt und mich immer unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
1. Einleitung	7
1.1 Biophysikalische Grundlagen	9
1.1.1 Ionisierende Strahlenarten	9
1.1.2 Wechselwirkung von Photonenstrahlung mit Materie	11
1.1.3 Wechselwirkung geladener Teilchenstrahlung mit Materie	12
1.1.4 Biologische Strahlenwirkung	16
1.2 Biologische Grundlagen	17
1.2.1 Struktur der DNA in höheren Eukaryonten	17
1.2.2 Modelle höher geordneter Chromatinstrukturen	20
1.2.3 Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen	23
1.2.4 Das <i>Random-Breakage</i> -Modell (RBM)	26
1.2.5 Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen und Bystander-Effekte	29
1.2.6 Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen	31
1.3 Ziele der Arbeit	36
1.3.1 Untersuchung zur Aufklärung der tertiären Chromatinstruktur	36
1.3.2 Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in der G ₀ /G ₁ -Phase des Zellzyklus	37
2. Material und Methoden	39
2.1 Zell- und molekularbiologische Methoden	39
2.1.1 Zellkultur und Zelllinien	39
2.1.2 Isolierung genomischer DNA und Elektrophorese	40
2.1.3 Southern-Hybridisierung mit regionenspezifischen DNA-Sonden	42
2.1.4 γ -H2AX - Immunfluoreszenzfärbung	45
2.2 Bestrahlungen	46
2.2.1 Röntgenbestrahlung	46
2.2.2 α -Bestrahlung	47
2.2.3 Schwerionenbestrahlung	50

2.3 Datenanalyse zur Bestimmung von Induktionsraten	52
2.3.1 Kalibrierung des Molekulargewichtes der durch Pulsfeldgelelektrophorese separierten doppelsträngigen DNA-Fragmente	52
2.3.2 Direkte DNA-Doppelstrangbruch-Quantifizierung	53
2.3.3 Quantitative Analyse - Bestimmung der Induktionsraten in verschiedenen Fragment-Größenbereichen mithilfe des RBM	54
2.3.4 Analyse der Reparatur dsDNA-Fragmente nach Bestrahlung mit dicht ionisierenden Teilchen	54
2.3.5 Poisson-Verteilung und Fläche des Zellkerns	55
3. Ergebnisse	57
3.1 Induktion von doppelsträngigen DNA-Fragmenten in stationären Zellen	58
3.1.1 Messung von DNA-Doppelstrangbrüchen mittels Pulsfeldgelelektrophorese	58
3.1.2 Direkte DNA-Doppelstrangbruch-Quantifizierung	63
3.1.3 DNA-Fragmentverteilungen in G ₀ /G ₁ -Zellen – Quantitative Analyse	65
3.1.4 DNA-Fragmentverteilungen in G ₀ /G ₁ -Zellen – Qualitative Analyse	70
3.2 Induktion von doppelsträngigen DNA-Fragmenten in exponentiell wachsenden und in mitotisch angereicherten Zellkulturen	74
3.2.1 Anreicherung und Messung mitotischer Zellen	75
3.2.2 Direkte DNA-Doppelstrangbruch-Quantifizierung	77
3.2.3 DNA-Fragmentverteilungen während des Wachstums und der Mitose – Quantitative Analyse	78
3.2.4 DNA-Fragmentverteilungen während des Wachstums und der Mitose – Qualitative Analyse	82
3.3 Induktion von doppelsträngigen DNA-Fragmenten in verschiedenen Genomregionen	85
3.4 Reparatur von doppelsträngigen DNA-Fragmenten in unterschiedlichen Fragment-Größenbereichen	89
3.5 Induktion und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen im Niedrigdosis-Bereich	96
3.5.1 Erwartete und mittlere Trefferzahl	97
3.5.2 H2AX Phosphorylierung – Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen	99

3.5.3 γ -H2AX Dephosphorylierung	
– Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen	103
4. Diskussion	107
4.1 Induktion von doppelsträngigen DNA-Fragmenten	107
4.1.1 Nachweis von inter- und intra-Track Fragmenten induziert durch dicht ionisierende Strahlung (Modell)	108
4.1.2 Einfluss physikalischer Parameter auf die Generierung doppelsträngiger DNA-Fragmente	111
4.1.3 Einfluss biologischer Parameter auf die Generierung doppelsträngiger DNA-Fragmente	115
4.2 Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen	121
4.2.1 Reparatur von doppelsträngigen DNA-Fragmenten	122
4.2.2 DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur nach Röntgen- und α -Teilchen-Niedrigdosis-Bestrahlungen	127
5. Zusammenfassung	131
6. Literaturverzeichnis	135
Veröffentlichungen	151
Lebenslauf	153
Eidesstattliche Erklärung	155

Abkürzungsverzeichnis

AT	Ataxia Teleangiectasia
ATCC	<i>American Type Cell Culture Collection</i>
ATM	<i>Ataxia Teleangiectasia Mutated</i>
ATR	<i>Ataxia Teleangiectasia Related</i>
BIBA	Biologische Bestrahlungsanlage (in der GSI)
bp	Basenpaar
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-DSB	DNA-Doppelstrangbruch
ECACC	<i>European Collection of Animal Cell Cultures</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eV	Elektronenvolt
FAR	<i>Fraction of Radioactivity Released</i>
FCS	fötales Kälberserum
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GSI	Gesellschaft für Schwerionenforschung
HR	Homologe Rekombination
ISIS	<i>In Situ Imaging System</i>
LET	Linearer Energietransfer
LMDS	<i>Locally Mutliply Damaged Sites</i>
MLS	<i>Multi-Loop Subcompartment</i>
NBS	Nijmegen-breakage-Syndrom
NHEJ	Nicht Homologe Endjoining
PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i>
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
RBM	<i>Random-Breackage-Modell</i>
RBW	Relative biologische Wirksamkeit
RMDS	<i>Regionally Multiply Damaged Sites</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RW/GL	<i>Random-Walk/Giant-Loop</i>
SCD	<i>Spherical 1 Mbp Chromatin Domain</i>

SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
SE	Standardfehler
SEM	Standardmittelfehler (<i>Standard Error of the Mean</i>)
SRIM	<i>The Stopping and Range of Ions in Matter</i>
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat (<i>standard saline citrat</i>)
SSPE	Natriumchlorid-Natriumdihydrogenphosphat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u	Unit ($1 \text{ MeV/u} \cong 1 \text{ MeV/Nukleon}$)
UNILAC	<i>Universal Linear Accelerator</i>
V(D)J	<i>Variable (Diversity) Joining</i>

Außerdem werden die allgemein üblichen Abkürzungen, sowie die Abkürzungen des SI-Einheiten-Systems verwendet.

1. Einleitung

Die strukturelle und funktionelle Grundeinheit des Lebens ist die Zelle. Im Laufe der Evolution entwickelte sich durch Differenzierung und Arbeitsteilung eine Vielzahl mehrzelliger Systeme. Der Grundaufbau blieb hierbei weitestgehend unverändert, so besitzen Zellen der Tiere, Pflanzen und Pilze eine gleichartige Struktur. Ebenso zeigen die drei großen phylogenetischen Reiche, die Eukaryonten, die Eubakterien und die Archaeobakterien eine Vielzahl an strukturellen und biochemischen Gemeinsamkeiten. Ein wesentlicher Schritt bei der Entstehung des Lebens ist demnach eine Interaktion von Informations- mit Funktionsmolekülen, der Desoxyribonukleinsäure (DNA) bzw. der Ribonukleinsäure (RNA) mit den Proteinen. Heutige wissenschaftliche Annahmen gehen davon aus, dass sich alle Lebensformen auf ein einziges Urgen, einer einfachen Nukleotidsequenz, zurückführen lassen. Dieses Urgen diente zugleich als Matrize für die eigene Vermehrung und der Herstellung eines Proteins, dessen Funktion in der enzymatischen Förderung eben dieser Vermehrung lag. Die Nukleotidsequenz des Gens konnte hierbei mithilfe des genetischen Codes in die entsprechenden Aminosäuresequenzen des Proteins umgewandelt werden.

Der Grundaufbau der DNA, bestehend aus vier verschiedenen Basen, welche an ein Zucker-Phosphatgerüst gebunden sind, blieb durch die Evolution unbeeinflusst. Die Länge der DNA selbst variiert von Art zu Art, so besitzt z.B. das Genom eines Polyoma oder SV-40 Virus eine Länge von 5,1 kbp, das Bakterium *Escherichia coli* 4000 kbp und das der Menschen sogar 3 100 000 kbp. Mit Zunahme der Länge korreliert auch eine strukturelle und funktionelle Komplexität der Organisation der genetischen Trägersubstanz, beginnend bei einem einfachen linearen Molekül bis hin zu einer Vielzahl von Chromosomen. Prinzipiell gilt: je höher ein Organismus entwickelt ist, desto komplexer wird die genetische Datenverarbeitung. Dies verdeutlicht sich in einem zunehmenden Zusammenspiel verschiedener Genkomponenten auf DNA-Sequenz-Ebene, wie Promotor- und *Enhancer*-Elementen oder einer wachsenden Organisation der DNA selbst, wie die Bildung von Nukleosomen, Chromatinfibern oder Chromosomen.

Um ein umfassendes Bild der Ausprägung der Vielzahl verschiedener Zelltypen und der damit verbundenen Unterschiede der Genregulation innerhalb eines komplexen multizellulären Organismus zu erhalten, ist es notwendig den strukturellen und funktionellen Aufbau der DNA gut zu verstehen. In den letzten Jahren fand hierzu eine rasante Aufklärung unseres Erbgutes statt. So wurde neben der fast vollständigen

Sequenzierung des menschlichen Genoms und vieler weiterer Modellorganismen, wie zum Beispiel *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster* oder *Mus musculus*, auch deren struktureller Aufbau untersucht. Es wird immer klarer, dass höher geordnete Chromatinstrukturen einen entscheidenden Einfluss auf viele Aspekte der Genregulation haben (Wolffe und Guschin 2000; Cremer und Cremer 2001). Derzeit wird die Organisation der DNA in drei verschiedene Stufen unterteilt (Woodcock und Dimitrov 2001). Die Primärstruktur beschreibt die einfache lineare Ordnung der DNA, zum Beispiel eine Kette von aufeinander folgenden Nukleosomen. Findet eine strukturelle Interaktion, z.B. über DNA-Linker, zwischen diesen Nukleosomen statt, wird von einer Sekundärstruktur gesprochen. Eine Interaktion der Sekundärstrukturen miteinander führt wiederum zur Bildung von Tertiärstrukturen, den höher geordneten Chromatinstrukturen. Die Primär- und Sekundärstrukturen sind mittlerweile sehr gut charakterisiert, wohingegen eine genaue Aufklärung der Tertiärstruktur in lebenden Zellsystemen nur bedingt erfolgen konnte. Dies liegt zum einen daran, dass die Chromatinorganisation in lebenden Zellen analysiert werden muss, welches zu einer Reduzierung der verfügbaren Techniken führt. Zum anderen können diese höher geordneten Chromatinstrukturen innerhalb des Zellzyklus einer Variation unterliegen. So sind zum Beispiel alle Chromosomen während der Mitose stark kondensiert, in der Interphase liegen sie hingegen in einer relaxierten Form vor. Ebenso variiert die Organisation der DNA auch innerhalb des einzelnen Genoms. Ein Beispiel hierfür ist der unterschiedliche Aufbau von transkriptionsaktiven (euchromatischen) und transkriptionsinaktiven (heterochromatischen) Regionen.

Trotz dieser Bedingungen konnten bereits Fortschritte hin zur Aufklärung von tertiären Chromatinstrukturen verzeichnet werden. So trug die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) zur Detektion der räumlichen Organisation großer Chromatindomänen während der Mitose und der Interphase bei (Ferreira *et al.* 1997; Müller *et al.* 2004). Mittels ionisierender Strahlung wurde das Zick-Zack-Modell (Rydberg *et al.* 1998a) zur Beschreibung der räumlichen Anordnung der Nukleosomen zueinander etabliert, welches eine Alternative zum Solenoid-Modell (Finch und Klug 1976) darstellt. Eine weitere Methode, die Verwendung bei der Untersuchung höher geordneter Chromatinstrukturen fand, ist die Rasterkraftmikroskopie (Tamayo 2003), die auf eine radiale Anordnung von "Loop"-Strukturen (Getzenberg *et al.* 1991) der 30 nm Chromatinfibern der DNA deutet. Um die Aufklärung der Tertiärstruktur weiter voranzutreiben, wurden verschiedene Computermodele, wie das *random-walk/giant-loop* Modell (Sachs *et al.* 1995; Yokota *et al.* 1995) oder das Multi-Loop-

Subkompartiment Modell (Münkel *et al.* 1999) entwickelt. Diese Modelle konnten allerdings bisher noch nicht experimentell bestätigt werden.

Eine geeignete Methode hierfür scheint die Verwendung dicht ionisierender Strahlung zu sein (Roti *et al.* 1993). Hierbei spielen die Energiedepositionen entlang der Teilchenbahnen und die dadurch verursachten DNA-Doppelstrangbrüche (DNA-DSBs) eine entscheidende Rolle. Je schwerer ($\hat{=}$ einer höheren Ladung) und je langsamer ein Teilchen ist, desto mehr Ionisationen (lokale Energiedepositionen) werden entlang seiner Bahn erzeugt (siehe z.B. Kraft und Krämer 1993). Eine Erhöhung der Ionisationsdichte führt wiederum zu einem Anstieg der DNA-Schädigung. Auf einer einzelnen Teilchenbahn können so viele sich teilweise überlappende Läsionen entstehen, die imstande sind korrelierte DNA-Schäden über größere Entfernungen hervorzurufen (Jakob *et al.* 2003). Die Verteilung der Schadensbereiche wird hierbei nicht nur von den physikalischen Eigenschaften der Teilchen, sondern auch von den strukturellen Bedingungen des Chromatinaufbaus abhängen. So werden zwei Stellen des Genoms durch ein einzelnes Teilchen seltener gleichzeitig geschädigt, die sich sowohl bei einer linearen Anordnung des DNA-Moleküls als auch über die räumliche Distanz weit voneinander entfernt befinden als Stellen, die zwar die gleiche lineare Entfernung besitzen aber räumlich nahe beieinander liegen (Goodhead 1994; Rydberg 2001). Daher kann erwartet werden, dass nach Bestrahlung mit dicht ionisierenden Teilchen die Verteilungen der generierten DNA-DSBs Informationen über die räumliche Anordnung des Chromatins enthalten.

1.1 Biophysikalische Grundlagen

Für ein besseres Verständnis der vorliegenden Arbeit wird in dem folgenden Kapitel auf die physikalischen Eigenschaften der verwendeten ionisierenden Strahlungen eingegangen.

1.1.1 Ionisierende Strahlenarten

Unter Strahlung wird der Transport von Energie bzw. von Energie und Materie, die nicht an Medien, wie Luft, Wasser oder Erde, gebunden sind, bezeichnet. Eine Form der

Energieübertragung ist die Photonenstrahlung, wobei sich kleine Energiepakete (Photonen/Quanten) wellenartig ausbreiten, weshalb auch von einem Welle-Teilchen-Dualismus gesprochen wird. Diese Strahlenart umfasst alle elektromagnetischen Strahlungen, von energiearmen Radiowellen bis hin zu energiereichen Gammastrahlen. Von besonderer biologischer Bedeutung ist das sichtbare Licht, das insbesondere bei der Energiegewinnung (Photosynthese) und Informationsgewinnung (Photorezeption) eine Rolle spielt. Energiereiche elektromagnetische Strahlung ($> 124 \text{ eV}$; Hall 2000) ist in der Lage Elektronen aus der Atomhülle der bestrahlten Materie zu lösen, weshalb sie auch zu den ionisierenden Strahlenarten gezählt wird. Elektronen-, Neutronen- oder auch Ionenstrahlungen, gehören zu den Teilchenstrahlungen, sie transportieren neben Energie auch Materie. Sobald ein Teilchen genügend Energie besitzt um ein Hüllenelektron aus der bestrahlten Materie herauszulösen ($10 - 100 \text{ eV}$), wird ebenfalls von ionisierender Strahlung gesprochen.

Röntgenstrahlung:

Röntgenstrahlung entsteht immer dann, wenn energiereiche geladenen Teilchen, wie z.B. Elektronen, auf Materie treffen. Die künstliche Erzeugung dieser ionisierenden elektromagnetischen Strahlenart erfolgt mittels einer Vakuumröhre (Röntgenröhre). Hierbei werden die an einer Glühkathode emittierten Elektronen durch eine angelegte Hochspannung zur Anode hin beschleunigt. Beim Auftreffen dieser Elektronen wird ein Teil ihrer Energie in elektromagnetische Strahlung umgewandelt. Den größten Teil hiervon stellt Wärmestrahlung dar, weshalb die Anode ständig gekühlt werden muss. Ein kleinerer Teil wird zu ionisierender Photonenstrahlung. Das so erhaltene Wellenlängenspektrum der Röntgenstrahlung besteht aus einem kontinuierlichen und einem diskreten Spektrum. Das kontinuierliche Spektrum entsteht beim Abbremsen der Elektronen im Kernfeld der Anodenatome und wird daher auch als Bremsspektrum bezeichnet. Die maximale Energie dieser Photonen ist hierbei durch die angelegte Beschleunigungsspannung gegeben. Dem Bremsspektrum sind die diskreten Linien der charakteristischen Strahlung überlagert. Diese Strahlung entstammt aus Übergängen der Hüllenelektronen des Anodenmaterials. Beim Auffüllen der Innenschalen der Atome der Anode wird elektromagnetische Strahlung emittiert, die für jedes Anodenmaterial charakteristisch ist.

Gammastrahlen besitzen die gleichen Eigenschaften wie Röntgenstrahlung, treten aber nur begleitend zu Kernprozessen auf. Die dabei freigesetzten Energien sind hierbei nur diskret.

α -Strahlung (radioaktiver Zerfall):

α -Teilchen bestehen aus zwei Neutronen und zwei Protonen, entsprechen also einem normalen Heliumkern. Daher nimmt beim radioaktiven Zerfall die Kernladungszahl um zwei und die Massezahl um vier ab. Die von einem instabilen Kern emittierten α -Teilchen können nur spezifische kinetische Energien besitzen, wodurch sich eine diskrete Energieverteilung ergibt. α -Zerfälle sind erst oberhalb einer Kernmasse von ca. 150 Nukleonen möglich, so ist der α -Strahler mit der kleinsten Masse ^{144}Nd (Neodym).

Ionenstrahlung (Teilchenbeschleuniger):

Das Prinzip eines Beschleunigers ähnelt dem der Röntgenröhre. Die Ionen werden erst aus einer Quelle emittiert und anschließend durch ein angelegtes elektromagnetisches Feld im Hochvakuum beschleunigt. Je nach Verwendung können diese Ionen, die lediglich aus Atomkernen bestehen, aufeinander geschossen oder auf ein beliebiges Zielobjekt gelenkt werden. Die Energie der Teilchen ist dabei von deren Ordnungszahl, von der angelegten Beschleunigungsspannung und von der Wegstrecke abhängig.

δ -Elektronen:

Während der Ionisationsprozesse durch Photonen- und Teilchenstrahlungen kann es zur Emission von δ -Elektronen kommen, die wiederum in Abhängigkeit von ihrer Energie in verschiedene Gruppen eingeteilt werden (Schmidt-Böcking *et al.* 1992; Kraft und Krämer 1993). Die Gruppe mit der höchsten Energie wird als so genannte δ -Strahlung klassifiziert. Diese sind durch sekundäre Ionisationen in der Lage die Energie in weiter entfernten Regionen zu deponieren.

1.1.2 Wechselwirkung von Photonenstrahlung mit Materie

Wird der Wellenlängenbereich von infrarotem Licht bis zu ultraviolettem Licht betrachtet, kommen vor allem zwei Wechselwirkungsarten der Strahlung mit Materie vor, die Streuung und die Absorption. Erstere führt lediglich zu einer Richtungsänderung der Lichtquanten. Absorption hingegen ist nur dann möglich, wenn die Energie eines Quants der Energiedifferenz zweier atomarer bzw. molekularer Energiezustände entspricht oder wenn die Energie des Quants größer ist als die Bindungsenergie der Elektronen. Diese absorbierte Energie kann auf verschiedene Art und Weise weitergegeben werden. Die wichtigsten hierbei sind Lichtemissionen, wie z.B. Fluoreszenz und Phosphoreszenz,

Umwandlung in Wärmeenergie und photochemische Reaktionen, wie z.B. in Sehfärbstoffen oder während der Photosynthese.

Medizinisch und technisch angewendete Photonenstrahlung umfasst den Bereich der nieder- und hochenergetischen Röntgenstrahlung (10 keV – 50 MeV), sowie Gammastrahlungen mit Energien ebenfalls bis zu mehreren Megaelektronenvolt. Wie auch beim sichtbaren Licht kann es zur Absorption und zur Streuung der Photonen kommen. Oft entstehen hierbei freie geladene Teilchen, welche zu sekundären Ionisationen oder zu Anregungen führen können. Die wesentlichen Wechselwirkungen ionisierender Photonenstrahlung mit Materie sind der Photo-, der Compton-, und der Paarbildungseffekt.

Beim Photoeffekt wird das Photon vollständig von einem Hüllenelektron absorbiert. Dieses Hüllenelektron wird anschließend freigesetzt, wodurch das Atom selbst ionisiert worden ist. Während der Photoeffekt vorwiegend an der K- oder L-Schale der Atomhülle auftritt, kann der Comptoneffekt auch an den äußeren Hüllenelektronen stattfinden. Dieser Effekt beschreibt die Streuung eines Photons an der Atomhülle, wobei das Photon ein Teil seiner Energie an ein Hüllenelektron überträgt, welches anschließend ebenfalls freigesetzt wird. Das gestreute Photon kann weitere Wechselwirkungen mit der umgebenden Materie eingehen. Bei der Paarbildung wechselwirken die einfallenden Photonen mit dem Coulombfeld des Atomkerns. Dabei entstehen spontan Elektronen-Positronen-Paare. Dieser Effekt ist erst möglich ab einer Energieschwelle, welche dem Masse-Äquivalent von zwei Elektronen entspricht (1,022 MeV).

Welcher Effekt vorherrschend ist, hängt von der Ordnungszahl des Absorbers und der Energie der Photonen ab. So dominiert bei hohen Ordnungszahlen ($Z > 60$; Neodym) uns unterhalb einer Energie von 0,3 MeV der Photoeffekt und oberhalb 4 MeV die Paarbildung. Bei niedrigen Ordnungszahlen ($Z < 8$; Sauerstoff) herrscht bei Energien zwischen 0,03 MeV und 3 MeV der Comptoneffekt vor (Evans 1968).

Allen elektromagnetischen Strahlungen ist ihre Schwächung in Materie gemein und kann vereinfacht mit dem Lambert-Beerschen Gesetz beschrieben werden. Demnach nimmt mit Zunahme der Eindringtiefe die deponierte Energie exponentiell ab.

1.1.3 Wechselwirkung geladener Teilchenstrahlung mit Materie

Bei der Betrachtung der Wechselwirkung geladener Teilchen mit Materie muss zwischen Elektronen und Ionen unterschieden werden. Grundsätzlich verhalten sich

zwar beide Teilchenarten gleich, aufgrund der geringeren Masse der Elektronen, welche ca. 2000 mal leichter als ein Proton bzw. Neutron sind, existieren jedoch einige Besonderheiten dieser Strahlung.

Für die Wechselwirkung von Elektronen mit Materie ist es unerheblich woher diese stammen, ob es Primärteilchen (β^- -Strahlung) oder ob es Sekundärteilchen (δ -Elektronen) sind. Aufgrund ihrer geringen Masse laufen Elektronen auf einem Zick-Zack-Kurs durch die bestrahlte Materie. Dies ist auf eine Vielzahl von elastischen und unelastischen Wechselwirkungen der Elektronen mit den Atomhüllen oder den Kernfeldern der Atome zurückzuführen. Elastische Ereignisse führen zu einer Richtungsänderung der Elektronen. Unelastische Ereignisse entziehen dem Elektron einen Teil seiner kinetischen Energie, so dass es am Ende seiner Wegstrecke die geringste Energie und die niedrigste Geschwindigkeit besitzt und schließlich stoppt. Die Änderungen der Strahlungseigenschaften führen daher zu einem Anstieg der deponierten Energie je Weglängeneinheit. Beschrieben wird dieses Verhalten durch einen Anstieg des linearen Energietransfers (LET) (Kraft und Krämer 1993).

Der LET geladener Teilchen ist der Quotient aus dem mittleren Energieverlust dE und dem zurückgelegten Weg des Teilchens dx (Gl. 1.1). Angegeben wird der LET zumeist in der Einheit $\text{keV}/\mu\text{m}$. Er wird neben der kinetischen Energie und Ladung der Teilchen ebenso von der Dichte und Kernladung der durchdrungenen Materie beeinflusst. Eingeführt wurde er um die unterschiedliche Wirkung verschiedener Strahlenarten erklären zu können. So nimmt z.B. die Proliferationsfähigkeit menschlicher Zellen rapide ab, wenn diese im Vergleich zu β^- -Strahlung (ca. $1 \text{ keV}/\mu\text{m}$) mit der gleichen Energiedosis α -Teilchen (ca. $100 \text{ keV}/\mu\text{m}$) bestrahlt wurden. Begründet ist dies in der unterschiedlichen Verteilung der deponierten Energie der Strahlung. Es wird hierbei zwischen locker ($< 3,5 \text{ keV}/\mu\text{m}$) und dicht ionisierender Strahlung ($> 3,5 \text{ keV}/\mu\text{m}$) unterschieden (Krieger und Petzold 1992). Beim Durchtritt durch Materie verhält sich der LET entsprechend der deponierten Energie der Teilchen: Mit zunehmender Eindringtiefe nimmt die Geschwindigkeit der Teilchen ab. Es kommt zu einer stärkeren Wechselwirkung der Teilchen mit der Umgebung. Die zunehmenden Wechselwirkungen sind mit einem Anstieg des LET, einem Anstieg des Energieverlusts der Teilchen, verbunden. Dies führt bis zu einem scharfen Maximum am Ende der Teilchenbahn hin (Bragg-Peak).

$$\text{LET} = \frac{dE}{dx} \quad (1.1)$$

LET – linearer Energietransfer; E – lokal absorbierte Energie; x – durchlaufend Wegstrecke

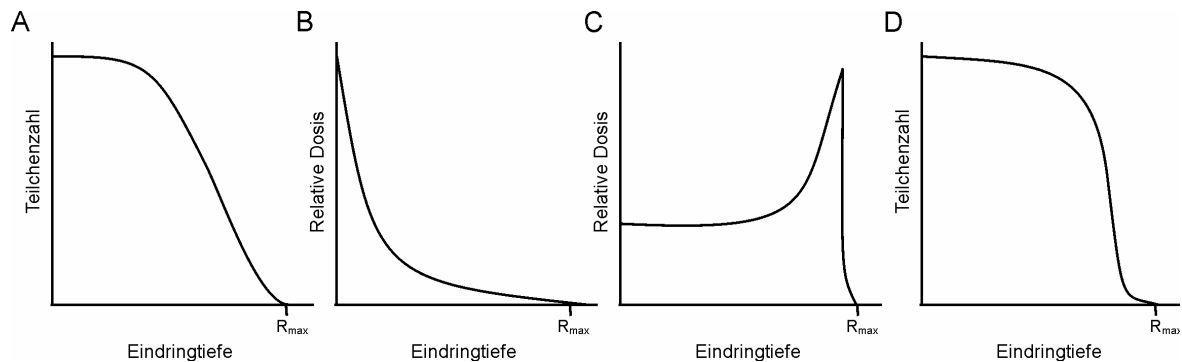


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Reichweiten- und Energieverteilung für Elektronen und Ionen.

Reichweitenverteilung monoenergetischer Elektronen (A) und monoenergetischen Ionen (D). Verteilung der deponierten Energie in Abhängigkeit von der Eindringtiefe für ein kontinuierliches e^- -Energiespektrum (B) und für ein einzelnes Ionen (C). R_{\max} ist die maximale Reichweite der Teilchen, welche durch ihre kinetische Energie vorgegeben ist.

Die in ursprüngliche Strahlrichtung zurückgelegte Strecke wird als Reichweite definiert und ist für monoenergetische Elektronenstrahlung weitestgehend gleich (Abb. 1.1A). Wegen der zufälligen Energieverteilung zwischen Elektron und Antineutrino während des β^- -Zerfalls können die Elektronen jede beliebige kinetische Energie zwischen Null und der maximal verfügbaren Energie besitzen. Dadurch existiert ein kontinuierliches Spektrum, so dass sich die Summe der deponierten Energie aller Teilchen wie in Abbildung 1.1B verhält. Mit Zunahme der Eindringtiefe nimmt die Energiedeponierung exponentiell ab.

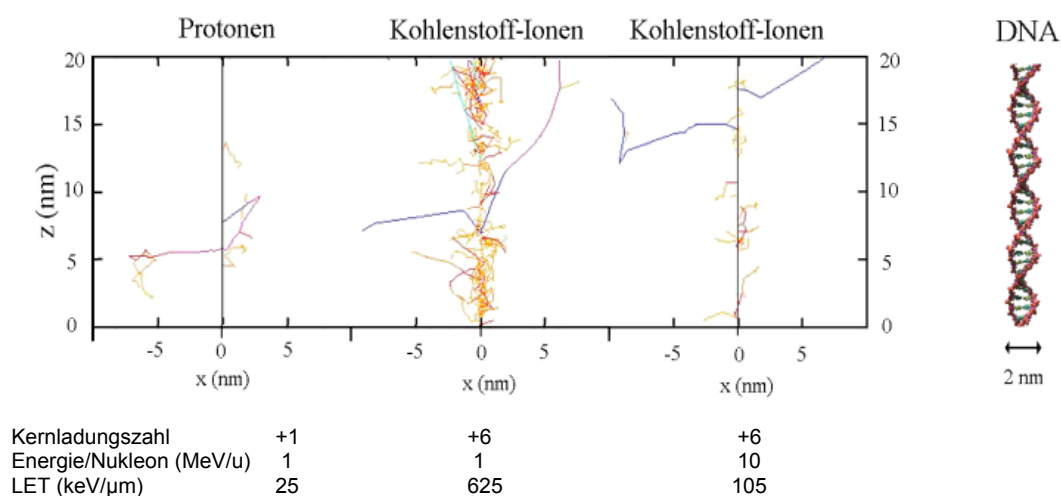


Abb. 1.2: Simulation der Bahnspuren verschieden dicht ionisierender Strahlungen.

Dargestellt ist jeweils ein Beispiel für die Abhängigkeit der Ionisationsdichte von der Kernladungszahl und der Geschwindigkeit der Teilchen. Rechts ist zur Veranschaulichung des Grades der Ionisationsdichte ein DNA-Molekül dargestellt. (aus Internet-Bildmaterial der Biophysik der GSI, Darmstadt [modifiziert]).

Die Wechselwirkungen von Ionen mit Materie hängen vor allem von deren kinetischen Energien, deren Ladung sowie deren Masse ab. Die Energieabgabe kann mittels des quantenmechanischen Bethe-Bloch Modells beschrieben werden (Bethe 1930; Bethe 1932). Eine vereinfachte Form ist in Gleichung 1.2 gegeben. Die Energieabgabe schwerer Teilchen hängt quadratisch von der Ladung ab. Bei hohen Energien sind die leichten Ionen vollständig ionisiert. So gibt ein Kohlenstoff-Ion dann z.B. eine $6 \times 6 = 36$ höhere Energie ab als ein Proton. Weiter nimmt mit dem Durchlaufen der Teilchen durch den Absorber deren Geschwindigkeit ab und je langsamer ein Ion ist (das Quadrat der Geschwindigkeit entspricht der kinetischen Energie pro Nukleon) desto mehr Energie wird im Absorber deponiert (Abb. 1.2). Am Ende seiner Bahn fängt das Ion mehr und mehr Elektronen ein, dadurch nehmen die effektive Ladung ab und folglich auch der LET. Schließlich kommt das Teilchen durch den vorangehenden Energieverlust der Wechselwirkungen mit dem Absorber zum Stillstand (Bragg-Peak) (Abb.1.1C). Durch ihre relativ hohe Masse werden schwere Teilchen weniger stark von Materie gestreut, worauf sich die schärfer definierte Reichweite dieser Teilchen (Abb. 1.2D) im Vergleich zu Elektronen (Abb. 1.1A) begründet.

$$\frac{dE}{dx} \approx \rho \cdot \frac{Z}{A} \cdot \frac{(z \cdot e)^2}{v^2} \quad (1.2)$$

ρ - Dichte des Absorbers; Z – Ordnungszahl des Absorbers; A - Massezahl des Absorbers;
 z - Ladungszahl des Ions; e – Elementarladung ($1,6 \cdot 10^{-19}$ C); v - Teilchengeschwindigkeit

Aufgrund der unterschiedlichen Energiedeposition unterschiedlich dicht ionisierender Strahlungen ist neben der Angabe der Energiedosis ($1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg}$) auch die Angabe der Teilchenanzahl pro Flächeneinheit von Bedeutung (Fluenz). Diese Fluenz wird in der Regel in Teilchen/cm² angegeben. Da bei gerichteter Bestrahlung der Materie eine direkte Proportionalität zur Dosis besteht, können diese Messgrößen problemlos ineinander umgerechnet werden (Gl. 1.3). Um die Dosis zu berechnen, die von einem Teilchenstrahl deponiert wird, muss die Dosis gleicher Teilchen (gleicher LET) mit dem Fluss dieser Teilchen pro Flächeneinheit F multipliziert werden.

$$D = \frac{F \cdot LET}{\rho} \quad (1.3)$$

ρ - Dichte des Absorbers; F - Fluenz; LET - linearer Energietransfer; D - Energiedosis

1.1.4 Biologische Strahlenwirkung

Locker und dicht ionisierende Strahlungen unterscheiden sich nicht nur durch ihre physikalischen Eigenschaften, sondern auch in ihren Wirkungen auf unterschiedliche biologische Endpunkte, wie z.B. dem Einfluss auf die Zellproliferation. Daher wurde um verschiedene Strahlenarten miteinander vergleichen zu können die relative biologische Wirksamkeit (RBW) eingeführt. Diese ist der Quotient aus den Energiedosen einer Referenzstrahlung und der zu testenden Strahlung bei gleicher biologischer Wirkung. Als Referenzstrahlung dient meist 250 keV Röntgenstrahlung oder ^{60}Co - γ -Strahlung. Die RBW ist somit nicht nur von den untersuchten biologischen Endpunkten oder den experimentellen Bedingungen, wie Dosis, Dosisleistung, Zellart und Sauerstoffumgebung, sondern auch von der Wahl der Referenzstrahlung abhängig.

Die Wirkung ionisierender Strahlung auf biologische Makromoleküle ist auf zweierlei Art und Weise möglich. Es wird hierbei zwischen der direkten und der indirekten Strahlenwirkung unterschieden (Goodhead 1994; Nikjoo *et al.* 1997). Die indirekte Strahlenwirkung beruht auf chemischen Sekundärprozessen, hervorgerufen durch Strahlungsabsorptionen in der Umgebung des geschädigten Moleküls. Eine besondere Rolle spielen dabei die Folgeprodukte aus der Radiolyse des Wassers, da diese nicht nur hochreaktiv sind, sondern durch einen etwa 80%igen Wasseranteil in den Zellen auch sehr häufig auftreten. So beruhen bei dünn ionisierender Strahlung circa 65% des an der DNA erzeugten Schadens auf Radikalen, welche durch die Ionisation des Wassers entstanden sind (Roots und Okada 1972; Chapman *et al.* 1973). Bei dicht ionisierender Strahlung dominiert hingegen der direkte Strahleneffekt (Roots *et al.* 1982).

Der wichtigste zu schädigende Teil der Zelle ist die DNA. Zwar können auch an Proteinen strahleninduzierte Schäden auftreten, allerdings gewährleisten jedoch der Abbau und die neue Synthetisierung dieser Proteine eine schnelle Korrektur des durch die Strahlung verursachten Schadens. Eine Schädigung der DNA löst in der Regel die Einleitung effektiver zellulärer Reparaturmechanismen aus (Ward 1988; Wood *et al.* 2001; Friedberg 2003; Christmann *et al.* 2003; Rothkamm und Löbrich 2003; Preston 2005), welche sich im Laufe der Evolution durch natürliche Strahlenexposition entwickelt haben. Eine ungenügende oder fehlerhafte Reparatur kann zu einer Störung des Zellstoffwechsels, den Verlust der Teilungsfähigkeit (Proliferation), zu Chromosomenaberrationen und Mutationen, sowie neoplastischen Transformationen bis hin zu Einleitung des Zelltodes (Apoptose) führen (Müller 1927; McClintock 1931; Sax 1939; Beadle und Tatum 1941; Bedford und Dewey 2002). Die resultierenden Schäden ionisierender Strahlung sind nicht nur auf die molekulare oder zelluläre Ebene

beschränkt, auch in Geweben und in kompletten Organismen können verschiedene Auswirkungen beobachtet werden, wie die Bildung von Tumoren, dem Versagen von Organen oder dem Tod der Individuen.

1.2 Biologische Grundlagen

1.2.1 Struktur der DNA in höheren Eukaryonten

Aufgrund der Größe eukaryontischer Genome muss zur Gewährleistung einer effizienten Verwaltung des Erbgutes die DNA in günstige Form gepackt werden. In Form eines einfachen Plasmids, wie es Bakterien besitzen, könnte durch enorme Länge und die räumliche Ausbreitung dieses Plasmids keine hinreichende Funktionalität gewährleistet werden. Diese Gewährleistung der Funktionalität des Genoms in Eukaryonten wird durch eine hierarchische Struktur der Faltung und der Kondensation mittels Protein-DNA Wechselwirkungen erreicht (Widom 1998; White *et al.* 2001), wobei drei verschiedene Stufen der Chromatinorganisation unterschieden werden (Woodcock und Dimitrov 2001).

Der einfache lineare Aufbau der DNA auf molekularer Ebene wird durch die Primärstruktur beschrieben (Abb. 1.3) (Simpson 1991; Lu *et al.* 1994). Durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den an ein Zuckerphosphatgerüst gebundenen Purin- und den komplementären Pyrimidinbasen wird die DNA-Doppelhelix gebildet. Die 1953 durch Watson und Crick beschriebene B-Form der Helix entspricht der unter physiologischen Bedingungen auftretenden Form der DNA. Alternativ existieren noch die ebenfalls rechtsgewundene A-Form, welche sich unter Hochsalzbedingungen bildet und die linksgewundene Z-Form, die in Guanin-Cytosin reichen DNA-Regionen vorkommen kann. Während der ersten Phase der DNA-Komprimierung läuft die physiologische Form der Helix $1\frac{3}{4}$ mal um ein Proteinoktamer. Die so entstandene Struktur, bestehend aus 146 DNA-Basenpaaren, je 2 Molekülen der Histone H2A, H2B, H3 und H4, wird Nukleosom genannt. Diese Nukleosomen sind durch bis zu 114 Basenpaar lange DNA-Linker verbunden, wobei ein weiteres Histon (H1) involviert sein kann. Aus einer Reihe solcher Chromatin-Untereinheiten entsteht die typische „beads-on-a-string“ Struktur der DNA, das 10 nm Interphasechromatin (Chatterjee und Holley 1991; Zlatanova und Leuba 2003).

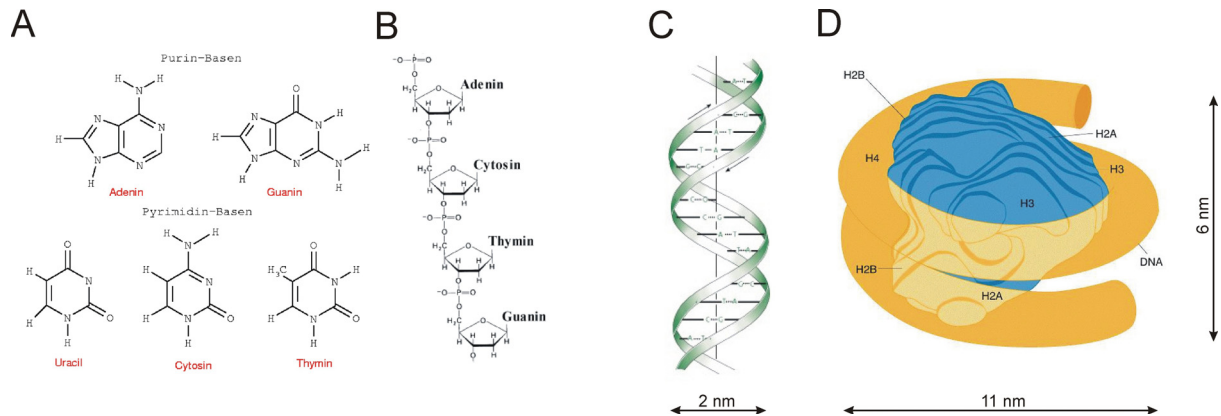


Abb. 1.3: Primärstruktur der DNA.

(A) chemische Struktur der Purin- und Pyrimidinbasen der DNA bzw. RNA; (B) chemische Struktur des Zuckerphosphatgerüsts; (C) schematische Struktur der DNA-Doppelhelix; (D) Schema der Struktur eines Nukleosoms (aus Snustad und Simons 1999).

Die sekundäre Chromatinstruktur wird durch eine Interaktion der Nukleosomen miteinander gebildet. Dadurch wird eine weitere Komprimierung der DNA erreicht. So wird aus dem ursprünglich 10 nm durchmessenden Chromatinfaden eine 30 nm dicke Chromatinfaser, die in isolierten Metaphasechromosomen elektronenmikroskopisch sehr gut sichtbar ist. Erste Experimente, die die genaue Anordnung der Nukleosomen innerhalb der 30 nm Faser zueinander untersuchten, wiesen auf eine solenoide Struktur hin, einem spiralartigem Gefüge des Interphasechromatins (Chatterjee und Holley 1993; Holley und Chatterjee 1996). Das heißt, die linear aufeinander folgenden Nukleosomen des 10 nm starken Chromatinfadens befinden sich in der zylindrischen Faser direkt nebeneinander.

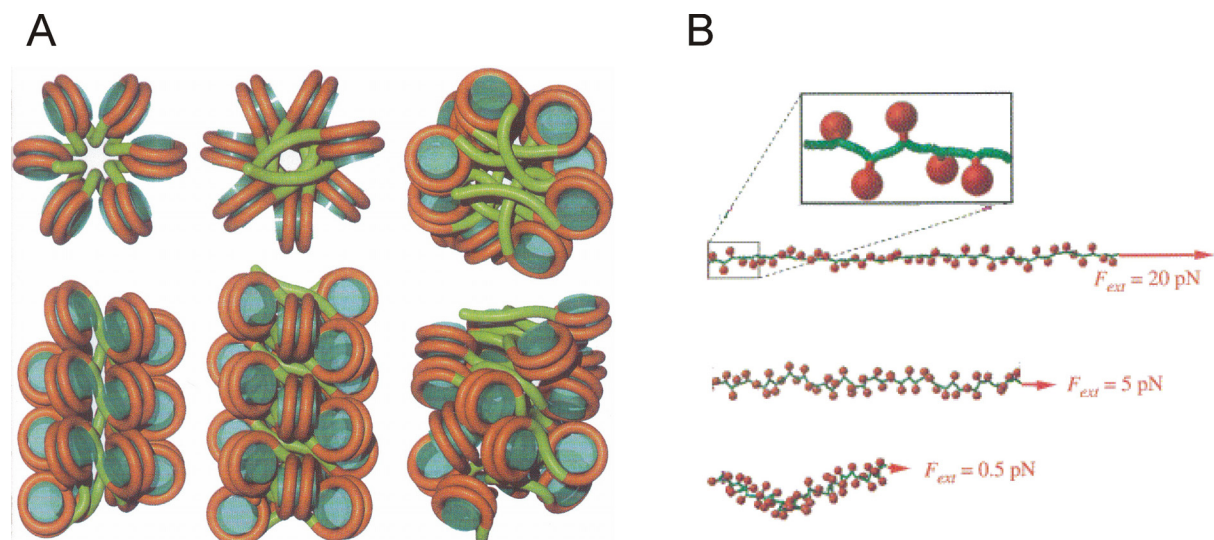


Abb. 1.4: Sekundärstruktur der DNA.

(A) Solenoid Modell (rechts), *cross-linker* Modell (Mitte) oder stochastisches Modell (links) der Anordnung der Nukleosomen zur Bildung der 30 nm Chromatinfaser in Aufsicht (oben) und Seitenansicht (unten) (aus Friedland *et al.* 1998); (B) Beispiele der Variabilität des Zick-Zack Modells (aus Katritch *et al.* 2000 [modifiziert])

Weitere Simulationen gingen von anderen Möglichkeiten des Aufbaus der Chromatinfaser aus (Abb. 1.4A). Eine Variante ist eine rein zufällige (stochastische) Struktur der Faser, wonach keine Regel existiert, welche die räumliche Ordnung der linear aufeinander folgenden Nukleosomen innerhalb der Faser beschreibt (Woodcock *et al.* 1993). Eine weitere Variante stellen *cross-linker* Formen dar. Hierbei befinden sich die benachbarten Nukleosomen des 10 nm Chromatinfadens auf gegenüberliegenden Seiten in der 30 nm Chromatinfaser (Friedland *et al.* 1998). Neuere Untersuchungen, welche unter der Verwendung ionisierender Strahlung durchgeführt wurden, zeigen einen Zusammenhang an überproportional induzierten DNA-Einzelstrangbruch-Fragmenten (Abb. 1.10B) und der Länge der DNA-Linker (Holley und Chatterjee 1996; Rydberg 1996; Rydberg *et al.* 1998a; Rydberg 2001). Diese Daten weisen vermehrt auf eine Anordnung der Nukleosomen in einer Zick-Zack-Form zueinander hin. Einen völlig anderen experimentellen Ansatz stellen die Rasterkraftelektronenmikroskopie (van Holde und Zlatanova 1995), die Benutzung molekularer Pinzetten (Cui und Bustamante 2000) oder die Kryoelektronenmikroskopie (Bednar *et al.* 1998) dar. Diese drei Methoden messen die Kraft, die zur Streckung der Chromatinfaser benötigt wird (Abb. 1.4B). Darauf basierende Modelle weisen ebenfalls auf eine irregulär, fluktuierende Zick-Zack Anordnung der Nukleosomen der 30 nm Chromatinfaser hin (Katritch *et al.* 2000; Schiessel *et al.* 2001).

Die meisten bisherigen Experimente und somit auch die darauf beruhenden Modelle zu Funktion und Bau der primären, sekundären und tertiären DNA-Struktur beruhen auf licht- und fluoreszenzmikroskopischen oder auf immunhistochemischen Methoden

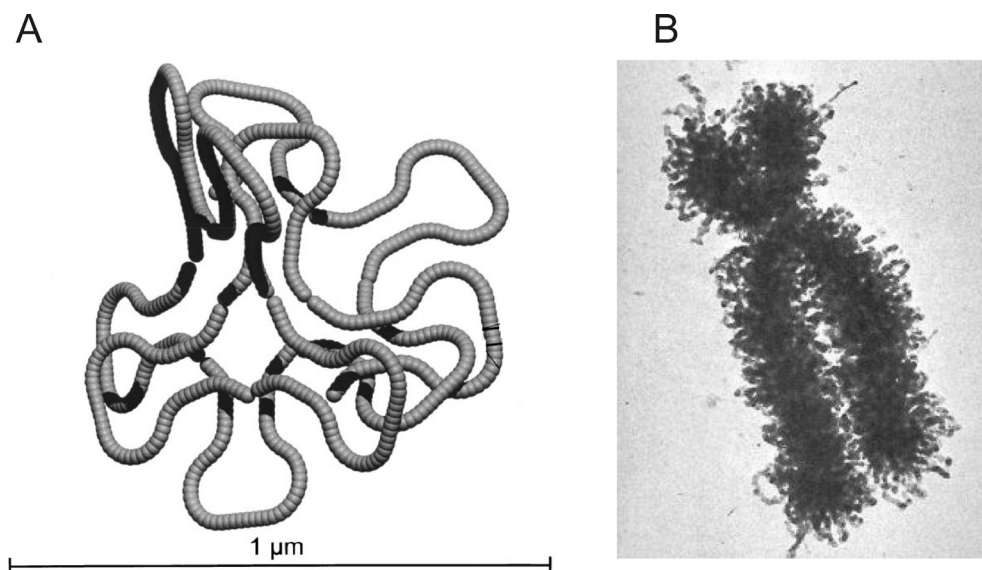


Abb. 1.5: Tertiärstruktur der DNA.

A) 1 Mbp langes DNA-Fragment gebildet aus 11 Chromatinloops (aus Friedland *et al.* 1999); (B) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines humanen Metaphasechromosoms mit deutlich sichtbarer 30 nm Chromatinfaser (aus Du Praw 1970).

(Belmont und Bruce 1994; Cremer und Cremer 2001). Ein wichtige Erkenntnis aus diesen Daten ist unter anderem, dass eine Variation am Linker-Histon H1 einen bedeutenden Einfluss auf die Stärke der Kondensation der 30 nm Chromatinfiber ausübt (Gilbert und Allan 2001; Green *et al.* 2001). Daher kann eine Beeinträchtigung der weitestgehend unbekannten tertiären Chromatinstruktur durch Veränderungen an Histon-Proteinen nicht ausgeschlossen werden (Horn und Peterson 2002). Weitere Untersuchungen deuten an, dass an der Bildung höher geordneter Chromatinstrukturen auch Nichthiston-Proteine, die „scaffold“-Proteine, beteiligt sind (Mirkovich *et al.* 1984; De 2002). Unabhängig der verwendeten Technik weisen jedoch alle Ergebnisse auf eine funktionell und strukturell höher geordnete Organisation der 30 nm Chromatinfiber hin. Dabei gehen bisherige Modelle von einer rein willkürlichen (stochastischen) bis hin zu einer geordneten Form der 30 nm Fiber selbst aus. Ein bedeutendes gemeinsames Merkmal vieler Modelle ist die Bildung von Chromatinschleifen, den so genannten Loops. Diese variieren ja nach Modell zwischen mehreren Mbp und einigen kbp. Ein Beispiel ist in Abbildung 1.5A gegeben, in diesem Modell wird von ca. 100 kbp Loops ausgegangen. Abbildung 1.5B zeigt letztlich die „quartäre“ Struktur der DNA, die Anordnung des Chromatins zu Chromosomen.

1.2.2 Modelle höher geordneter Chromatinstrukturen

Bislang wurden verschiedene Modelle, die von einer rein zufälligen bis hin zu einer hoch organisierten Anordnung der Chromatinfiber reichen, entwickelt. Diese Modelle beinhalten irregulär gefaltete Chromatinfibern (DuPraw 1965), radiale Loop-Strukturen (Manuelidis und Chen 1990), *giant-loop* Strukturen (Ostashevsky und Lange 1994) oder eine stochastische Anordnung der DNA (Hahnfeldt *et al.* 1993).

Ein Modell stellt das Chromonema Modell dar. In diesem wird angenommen, dass sich die 30 nm Chromatinfiber durch Faltungsprozesse verdickt und so Abschnitte von ca. 120 nm und mehr entstehen können (Belmont und Bruce 1994). Auf Grundlage modernerer Simulationen und Experimente konnten aber zwei genauere, miteinander konkurrierende Modelle entwickelt werden, das *random-walk/giant-loop* Modell (RW/GL) (Sachs *et al.* 1995; Yokota *et al.* 1995) und das *multi-loop subcompartment* Modell (MLS) (Münkel und Langowski 1998; Münkel *et al.* 1999).

Abbildung 1.6A zeigt eine schematische Darstellung des RW/GL Modells. Mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen wurden spezifische DNA-Sequenzen (a-j) gekenn-

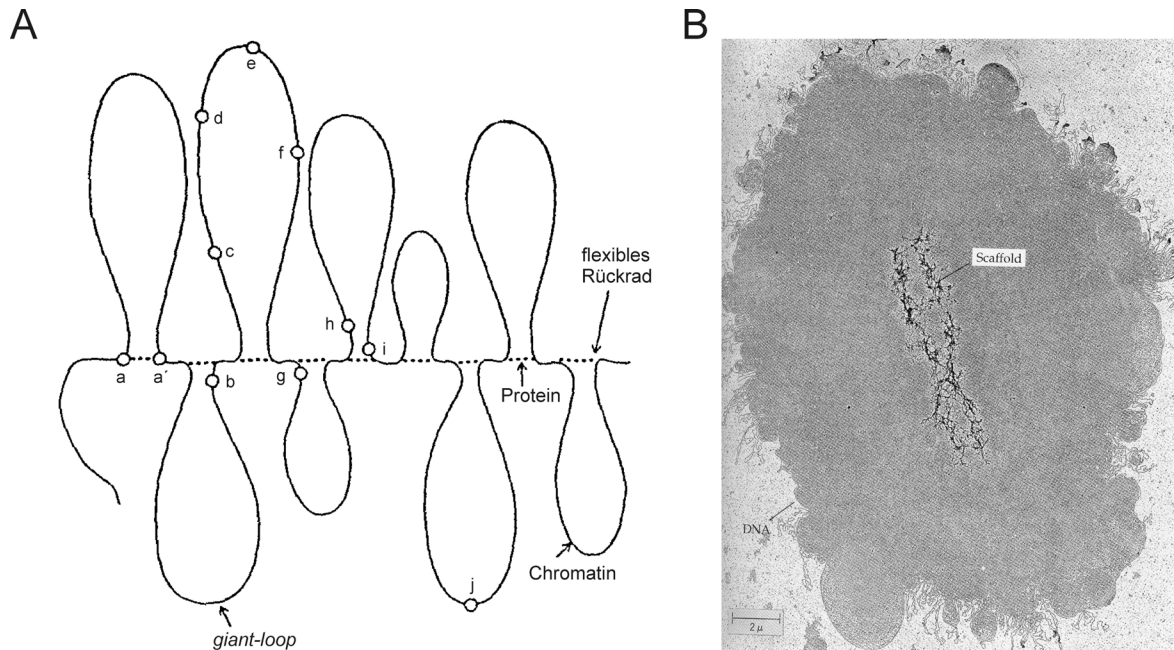


Abb. 1.6: *random-walk/ giant-loop* Model.

(A) Die bis zu einigen Mbp großen Loops werden an den *loop-attachement-points* (a, a') durch „scaffold“-Proteine mit dem Loop-Rückrad (gestrichelte Linie) verbunden. Die räumlichen Abstände zwischen Punkten nahe des Loop-Rückrads (a, b, g, h, i) werden nur durch dessen Charakteristik beeinflusst. Die markierten DNA-Sequenzen b-g beschreiben den Verlauf eines Loops. So ist der gemessene Abstand von b zu g kleiner als von b zu e. (aus Yokota *et al.* 1995) (B) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines menschlichen Metaphase-Chromosoms, in welchem alle Histone heraus gewaschen wurden. Anhand der „scaffold“-Matrix ist die ursprüngliche Form des histonhaltigen Chromosoms zu sehen (aus Paulson und Laemmli 1977).

zeichnet und anschließend der Abstand der so definierten Stellen zueinander bestimmt. Dabei ergaben sich zwei Beziehungen beim Vergleich der geometrischen und der genomischen Distanz der markierten Punkte miteinander; dem Vergleich zwischen dem gemessenen mittleren räumlichen Abstand und der linearen Entfernung auf der DNA. Eine Beziehung beschreibt eine bis zu 3 Mbp umfassende Schleifenbildung der 30 nm Chromatinfiber, die in Abbildung 1.6A durch die Punkte b-g dargestellt ist. Innerhalb eines solchen *giant-loops* folgt das Chromatin hierbei einer willkürlichen Bahn (*random-walk*). Diese *giant-loops* entstehen durch DNA-Protein-Vernetzungen, den *loop-attachement-points* (a und a'), an den „scaffold“-Matrices, den zentralen nichthistonhaltigen Proteinkomplexen der Chromosomen (Abb. 1.6B). Durch die Ermittlung der Abstände zwischen diesen Punkten und Punkten die sich sehr dicht am Loop-Rückrad befinden (Abb. 1.6A Punkte b, g, h und i), konnte eine weitere Beziehung zwischen geometrischer und genomischer Distanz identifiziert werden. Diese liegt in einem Größenbereich von 10 Mbp bis 200 Mbp und kann daher eine weitere mögliche Unterstruktur der Chromosomen widerspiegeln. Das Loop-Rückrad selbst verhält sich dabei ebenso wie ein einzelner *giant-loop*, es folgt keinem gerichteten Pfad, sondern

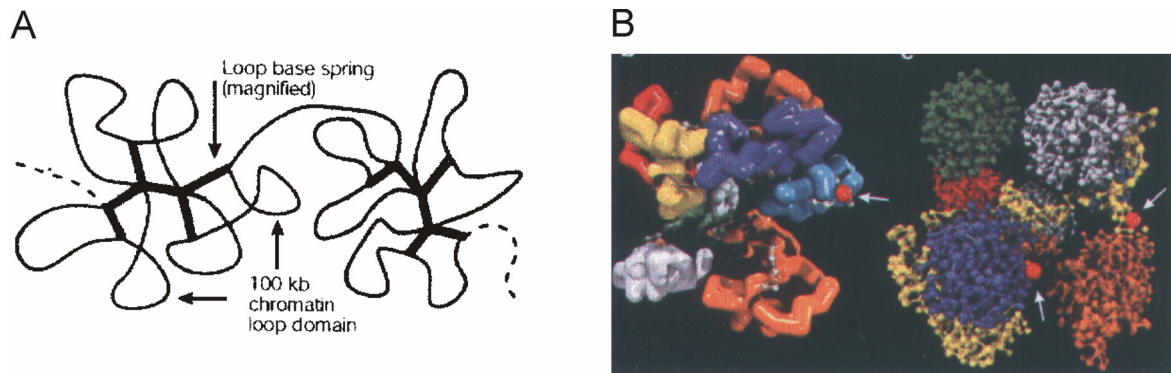


Abb. 1.7: *multi-loop subcompartment* Model.

(A) Zwei 1 Mbp große *subcompartments* bestehend ca. 100 kbp langen Chromatinfibern, die durch kleinere Chromatinfragmente (fett) verbunden sind (aus Münkler *et al.* 1999) (B) 3D-Modelle einer 1 Mbp großen Chromatinregion bestehend aus zehn 100 kbp Loops dargestellt in einer kompakten 30 nm Chromatinfaser (links) oder als einzelne Nukleosomen in einer Zick-Zack Form (rechts) (aus Cremer *et al.* 2000).

einer willkürlichen Bahn (zufällige Bahn): Es ist ebenfalls „*random-walk*“.

Wie dem RW/GL Modell liegt auch der Entwicklung des MLS Modells die Korrelierung der Abstände zwischen spezifischen DNA-Markern zugrunde. Dieses Modell (Abb. 1.7) beschreibt ebenfalls mehrere mögliche Substrukturen der tertiären Chromatinorganisation, eine im Bereich von ca. 1 Mbp und eine im Bereich von 10-100 Mbp. Der entscheidende Unterschied zwischen beiden Modellen ist die rosettenartige Anordnung kleinerer „*random-walk*“ Loops (100 kbp-200 kbp) des MLS Modells, die durch kurze starre Chromatinfragmente verbunden sind. Circa 10 dieser Loops bilden ein 1 Mbp großes *subcompartment* und stellen eine Chromatindomäne dar, die in etwa der eines *giant-loop* des RW/GL Modells entspricht. Eine Weiterentwicklung des MLS Modells stellt das *spherical 1 Mbp chromatin domain* (SCD) Modell dar (Cremer *et al.* 2001; Kreth *et al.* 2004). In diesem wird jedes Chromosom als eine Kette von ca. 1 Mbp großen Sphären beschrieben, die durch Chromatin-Linker verbunden sind.

Die in beiden Modellen beschriebene Beziehung zwischen genomischer und geometrischer Distanz um eine Größe von 10 Mbp kann ein Hinweis darauf sein, inwiefern die tertiäre Chromatinstruktur am Aufbau der Chromosomen beteiligt ist. Hierbei wird davon ausgegangen, dass ca. 10 bis 20 *giant-loops* bzw. Chromatindomänen Micellen bilden, die sich linear entlang eines Chromosoms befinden (Abb. 1.8) (Ostashevsky 1998; Ostashevsky 2000).

Alle bisherigen Messungen und somit ebenfalls die Modelle beruhen auf Methoden, die eine Veränderung des umgebenden Mediums der DNA unumgänglich machen. Dies kann weitreichende Folgen auf die Chromatinorganisation nach sich ziehen, so führt etwa das Auswaschen der Histone zu einer vollständigen Dekondensation der

Chromosomen. Somit fehlt ein direkter Bezug zu lebenden Systemen. Eine geeignete Methode zur Untersuchung des DNA-Aufbaus in lebenden Systemen ist die Verwendung dicht ionisierender Strahlung (Roti *et al.* 1993). Durch die Strahlung wird eine direkte Messung der Induktion von doppelsträngigen (ds) DNA-Fragmenten unter nativen Bedingungen ermöglicht (Rydberg *et al.* 1998a). Die erhaltenen Verteilungen enthalten dabei Informationen über die räumliche Struktur der DNA. Für die Generierung von dsDNA-Fragmenten spielen hierbei die Energiedepositionen der Teilchen entlang ihrer Bahn eine entscheidende Rolle.

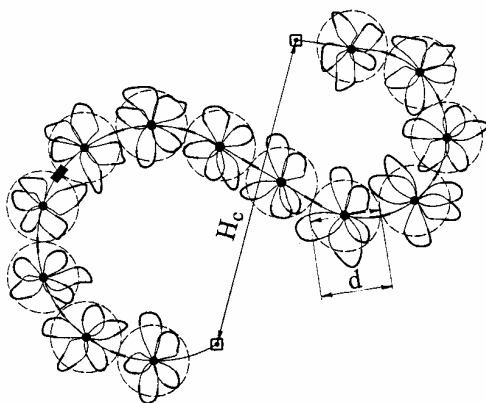


Abb. 1.8: Schematische Darstellung eines G₁-Chromosoms mit linear angeordneten Micellen. Das schwarze Rechteck symbolisiert das Zentromer, die offenen Quadrate die Telomere. H_c spiegelt die geometrische Länge des Chromosoms wider. d (ca. 1 Mbp) und die gestrichelten Kreise stellen den Durchmesser bzw. den Umfang einer Micelle dar (aus Ostashevsky 2000).

1.2.3 Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen

Die endogene Generierung von DNA-DSBs, z.B. während der DNA-Replikation, der Chromosomensegregation, der V(D)J-Rekombination (*variable diversity joining*) in B- und T-Lymphozyten oder während der Apoptose, spielt eine essentielle Rolle für die Entwicklung und das Überleben der Organismen. Dahingegen können durch exogene Agenzien induzierte DNA-DSBs eine enorme Belastung darstellen. Eine der bedeutendsten Agenzien zur Induzierung von DNA-Läsionen ist ionisierende Strahlung.

Durch den direkten bzw. den indirekten Strahleneffekt geht neben der Induzierung von DNA-DSBs eine Generierung weiterer verschiedener DNA-Schäden einher. So induziert ein Gray Röntgenstrahlung ca. 35 DNA-DSBs sowie 1000 Einzelstrangbrüche und bis zu 10 000 Basenschäden (Ward 1995; Ward 1998). Einzelstrangbrüche und Basenschäden werden durch zelluläre Reparaturmechanismen sehr schnell und akkurat entfernt, so dass sie keinen signifikanten Einfluss auf das Zellüberleben ausüben (Ward *et al.* 1985).

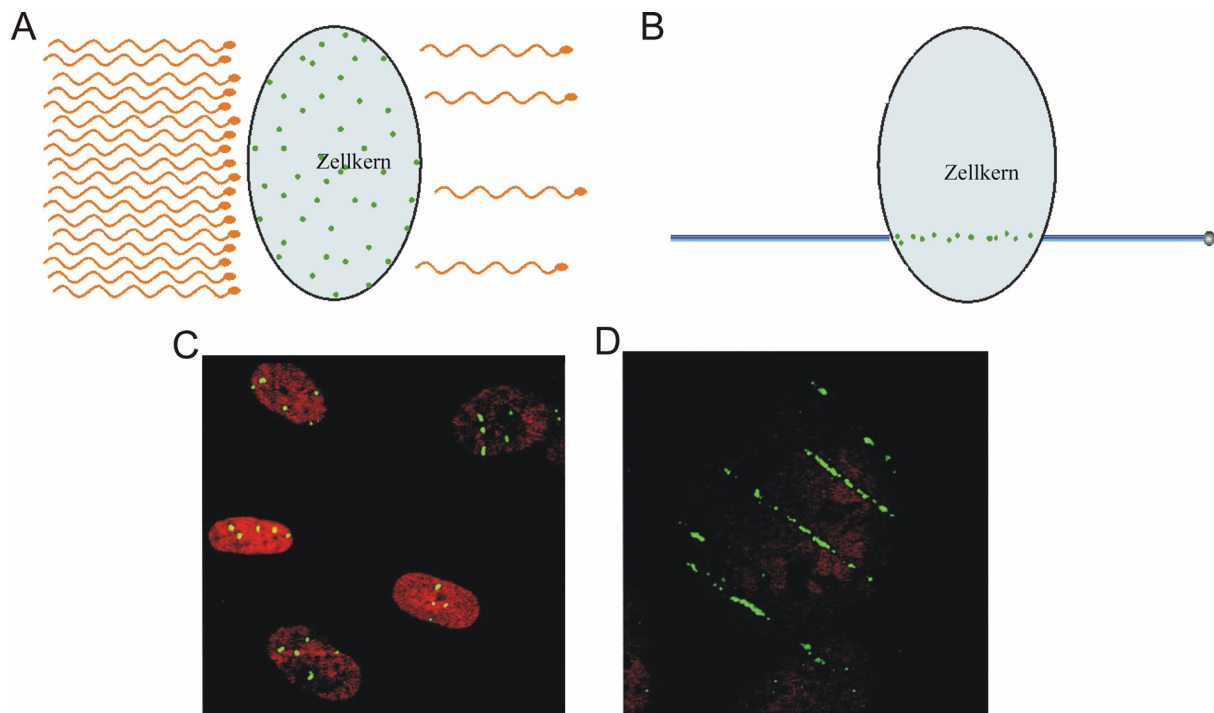


Abb. 1.9: Induzierung von DNA-DSBs in Abhängigkeit von physikalischen Strahlenparametern. (A) Schematische Darstellung einer stochastischen Verteilung von DSBs (grüne Punkte) nach Röntgenbestrahlung. (B) Schematische Darstellung der Generierung von DSBs entlang der Bahnspur nach Teilchenbestrahlung. (C, D) Immunzytochemischer Nachweis von MRE11B, einem DNA-Reparaturprotein, in menschlichen Fibroblasten nach senkrechter (C) und um 4° geneigter waagerechter (D) Bestrahlung mit 4,1 MeV/u Bismuth-Ionen. (aus Jakob *et al.* 2003)

Demnach sind die entscheidenden Läsionen DNA-DSBs. Der Entstehung eines DNA-DSB geht stets die Erzeugung mindestens zweier Einzelstrangbrüche voraus, die sich in weniger als 10 Basenpaaren Entfernung zueinander befinden (Nikjoo *et al.* 1997). Dadurch stellt ein DNA-DSB immer eine Clusterung mehrerer DNA-Läsionen dar. Die so geschädigten Stellen der DNA werden als *locally multiply damaged sites* (LMDS) bezeichnet (Goodhead 1994; Hall 2000). Mit steigendem LET nimmt die Komplexität der einzelnen Schadenstellen nicht nur zu, sondern diese komplexeren LMDS werden gleichzeitig entlang der Bahn des Teilchens häufiger generiert. Deshalb können nach Bestrahlung mit hoch-LET Teilchen viele sich teilweise überlappende LMDS (Abb. 1.9) entstehen, welche korrelierte DNA-Schäden über größere geometrische und genomische Entfernungen hervorrufen können.

In Analogie zum Terminus LMDS werden Schadens-Cluster, welche durch die nukleosomale Struktur und die Anordnung der DNA in der 30 nm Chromatinfaser bedingt sind, als *regionally multiply damaged sites* (RMDS) bezeichnet (Prise *et al.* 2001). Eine solche Clusterung von Einzel- und Doppelstrangbrüchen mit einer von der primären und sekundären Chromatinstruktur abhängigen DNA-Fragmentlängenverteilung konnte nachgewiesen werden (Rydberg *et al.* 1998a) (Abb. 1.10). In diesen Experimenten

wurden menschliche Fibroblasten während der G₀-Phase des Zellzyklus und CHO-Zellen (*chinese hamstery ovary*) während der Mitose mit Röntgenstrahlung und mit Helium- bzw. Stickstoff-Ionen bestrahlt. Die 5' Enden der erhaltenen DNA-Fragmente wurden radioaktiv markiert (Sambrook und Russell 2001), anschließend fand die Auftrennung der DNA in einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel statt. Hierbei ergaben sich unabhängig von der Zellzyklusphase Häufungen von Fragmenten, welche eine charakteristische Größe von Chromatinstrukturen besaßen (Abb. 1.10B). Die auf diesen charakteristischen Fragmentlängen beruhende Simulation unterstützt das Modell einer räumlichen Anordnung der Nukleosomen in einer Zick-Zack-Form zueinander. Weitere theoretische Monte-Carlo-Simulationen deuten ebenfalls auf einen Zusammenhang der durch ionisierende Strahlung erzeugten DNA-Fragmente und der nukleosomalen Architektur hin (Friedland *et al.* 1998; Friedland *et al.* 1999).

Die in Abbildung 1.10B dargestellte Fragmentverteilung zeigt, dass die Induktion von DNA-DSBs selbst durch locker ionisierende Strahlung (Röntgenstrahlung) nicht stochastisch ist. Ein Zusammenspiel der physikalischen Eigenschaften der Strahlungen und der biologischen Struktur des Chromatins führt dazu, dass selbst nach Röntgenbestrahlung eine *non-random* Komponente auftritt. Es entstehen charakteristische Fragmente, welche auf zwei voneinander „abhängig“ induzierten DNA-DSBs beruhen.

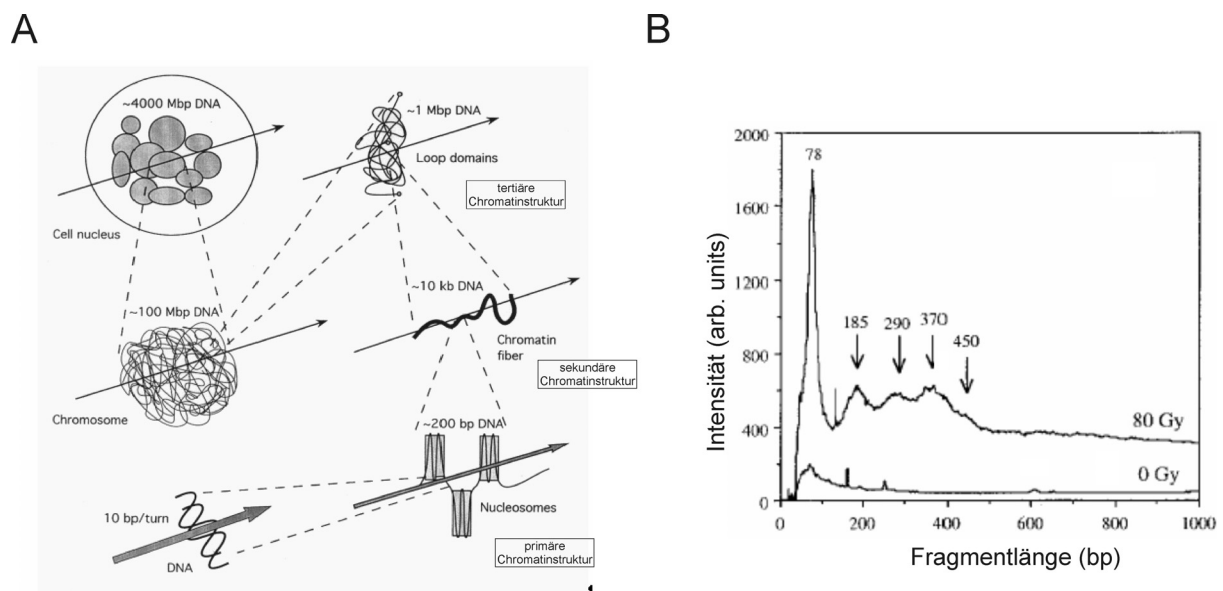


Abb. 1.10: Induzierung von DNA-Schäden in Abhängigkeit der Chromatinorganisation.

(A) Clusterung von DNA-Schäden auf allen Level der Chromatinorganisation. Die Pfeile deuten die Flugrichtung eines ionisierenden Teilchens an, das entlang seiner Bahnspur viele LMDS erzeugt. (aus Rydberg 1998b [modifiziert]) (B) Einzelstrangbruch-Fragmentlängenverteilung als Funktion der Intensität (Anzahl der Fragmente) nach 80 Gy Röntgenbestrahlung. Die Pfeile deuten auf die Maxima, welche der Berechnung des Zick-Zack Modells zugrunde gelegt wurden, so entsprechen Fragmente mit 78 bp einer Windung um das Histonoktamer und 370 bp dem Abstand direkt benachbarten Nukleosomen des Modells (= 4 Windungen + 2 Linker). (aus Rydberg *et al.* 1998a)

Nach Bestrahlung mit hoch-LET Teilchen ist ein solches Verhalten von Anfang an zu erwarten, da sich fast alle DNA-Läsionen entlang der Bahnspur verteilen (vergleiche Abb. 1.9A und B) und somit die induzierten DNA-DSBs einer „Abhängigkeit“ zueinander stehen (von einem einzigen Teilchen erzeugt). Durch diese ungleichmäßige Verteilung von DNA-DSBs werden einerseits weite Bereiche der DNA wenig oder kaum geschädigt. In Genombereichen, die einen Teilchendurchgang erfahren, werden hingegen als Folge dieses Durchgangs viele kleine Fragmente generiert. Dieser Effekt wird durch eine Erhöhung des LET weiter verstärkt (siehe z.B.: Löbrich *et al.* 1996; Kraxenberger *et al.* 1998, Höglund *et al.* 2000). Ein Modell, das die Induktion von DNA-DSBs vor allem nach locker ionisierender Strahlung zu beschreiben versucht, ist das *Random-Breackage*-Modell.

1.2.4 Das *Random-Breackage*-Modell (RBM)

Eine Methode zur quantitativen Bestimmung von DNA-DSBs ist die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE). Sie beruht auf der Analyse der Verteilungen der durch die Strahlung generierten dsDNA-Fragmente. Mittels PFGE konnte gezeigt werden, dass bei einer linearen Erhöhung der Dosis der Anteil der ins Gel eluierten DNA nicht-linear zunimmt. Das heißt, es werden bei einer linearen Zunahme von DNA-DSBs mehr kleine dsDNA-Fragmente generiert als dies unter der Voraussetzung einer ebenfalls linearen Generierung dieser dsDNA-Fragmente erwartet würde (Lehmann und Ormerod 1970; Corry und Cole 1973; Radford und Hodgson 1985; Blöcher *et al.* 1989; Blöcher 1990). Um das dosisabhängige Verhältnis zwischen induzierten DNA-DSBs und der Anzahl an generierten dsDNA-Fragmenten erklären zu können, wurde ein theoretisches Modell der DNA-DSB Induktion entwickelt (Blöcher 1990). Dieses *Random-Breackage*-Modell (RBM) ist in der Lage die Anzahl der erhaltenen dsDNA-Fragmente bzw. deren Masseverteilung als Funktion der Wanderungsstrecke im PFGE-Gel bzw. der Fragmentgröße in Abhängigkeit von der Dosis weitestgehend zu beschreiben. Das Modell basiert auf dem Konzept einer stochastischen Depolymerisation eines langkettigen Moleküls (Montroll und Simha 1940), wobei diploide menschliche DNA mit ca. 6 Gbp Länge das Polymer und ein DNA-DSB ein Zerfallsereignis darstellen. Des Weiteren setzt das Modell zwei Annahmen voraus:

- DNA-DSBs werden unabhängig voneinander induziert.
- jedes Glied (x) eines Polymers besitzt die gleiche Wahrscheinlichkeit (P) einen Bruch zu erleiden (Gl. 1.4) bzw. nicht geschädigt zu werden (1-P) (Gl. 1.5).

Beispielsweise heißt das, dass nach Röntgenbestrahlung mit einer Dosis von 1 Gy (Induktion von 35 DNA-DSBs) die Wahrscheinlichkeit der Induktion eines DNA-DSBs am menschlichen Genom an einer beliebigen Stelle (x) $5,83 \times 10^{-9}$ (35 DNA-DSBs / 6 Gbp) bzw. 0,999'999'994'17 für eine „Nicht-Schädigung“ beträgt. Wird eine Zelle hingegen mit 60 Gy bestrahlt, erhöht sich die Wahrscheinlichkeit eines Treffers an der Stelle (x) auf $3,5 \times 10^{-7}$ (35 DNA-DSBs * 60 / 6 Gbp). Demnach sinkt die Wahrscheinlichkeit nicht getroffen zu werden auf 0,999'999'65.

$$P_{x-1} = P_x = P_{x+1} = P \quad (1.4)$$

$$1 - P_{x-1} = 1 - P_x = 1 - P_{x+1} = 1 - P \quad (1.5)$$

P – Wahrscheinlichkeit der Induzierung eines DSB; x – beliebiges Monomer der Polymerkette;

P_x – Wahrscheinlichkeit der Induzierung eines DNA-DSB an der Stelle x;

P_{x-1} – Wahrscheinlichkeit der Induzierung eines DNA-DSB ein Monomer vor x

Diese Annahmen verdeutlichen bereits die Limitierung des Modells in Bezug auf die Generierung korrelierter DNA-Schäden nach hoch-LET Bestrahlung (Holley und Chatterjee 1996; Rydberg 1996). Auch kann der Einfluss der Chromatinstruktur auf die Induktion von DNA-DSBs nicht berücksichtigt werden. So sind RMDS, welche selbst durch die dünn ionisierende Röntgenstrahlung hervorgerufen werden können, in der Lage zu einer Abweichung des Modells im Vergleich zu den experimentell ermittelten Daten beizutragen (Rydberg *et al.* 1998a).

Mithilfe der obigen Annahmen kann nun die Wahrscheinlichkeit (P_k) der Generierung eines Fragments der Länge k berechnet werden. Von einem Ende (Anfang) des Polymers ist diese das Produkt aus der Wahrscheinlichkeit eines Treffers am Monomer k (= P) und der Wahrscheinlichkeit, dass an allen vorherigen Monomeren (1 bis k-1) kein DNA-DSB induziert worden ist (Gl. 1.6). Da die Wahrscheinlichkeit eines Bruches der Quotient aus der Anzahl der Brüche (r) und der Länge des Polymers (n) ist, ergibt sich Gleichung 1.7.

Wird eine menschliche Zelle mit 60 Gy Röntgenstrahlung behandelt, wird mit einer Wahrscheinlichkeit von $3,499 \times 10^{-7}$ ein DNA-Fragment bestehend aus 3 Nukleotiden generiert ($3,5 \times 10^{-7} * (1 - 3,5 \times 10^{-7}) * (1 - 3,5 \times 10^{-7})$). Der Anteil an 6 Mbp großen DNA-Fragmenten beträgt nach gleicher Rechnung $4,3 \times 10^{-8}$.

$$P_k = P \cdot (1 - P)^{k-1} \quad (1.6)$$

$$P_k = \frac{r}{n} \cdot \left(1 - \frac{r}{n}\right)^{k-1} \quad (1.7)$$

P_k – Wahrscheinlichkeit der Generierung eines Fragments der Länge;

P – Wahrscheinlichkeit der Induktion eines DNA-DSBs;

r – induzierte DSBs; n – Polymerlänge; k – Fragmentlänge

Eine gleichmäßige Markierung eines Polymers, z.B. durch eine Ethidiumbromid-Färbung der DNA, ermöglicht die Messung des Anteils der totalen Masse (F) eines Fragments der Länge k . Berechnet werden kann diese Masse aus dem Produkt der Anzahl der Fragmente der Länge k und dem Anteil eines solchen Fragments am gesamten Molekül (Gl. 1.8). Die Anzahl an Fragmenten der Länge k ergibt sich durch eine Multiplikation der Wahrscheinlichkeit der Induktion der Fragmente (P_k) mit der Anzahl an DNA-DSBs (r). Der Anteil eines Fragments der Länge k am gesamten Genom ergibt sich aus dem Quotienten der Fragmentlänge (k) und der Polymerlänge (n). Die Genomlänge in Säugerzellen beträgt ca. 10^7 bp bis 10^9 bp, dies ermöglicht es rechnerisch eine unendliche Länge des Polymers anzunehmen, so dass $(1-r/n)^n$ durch e^{-r} ersetzt werden kann, woraus sich Gleichung 1.9 ergibt.

Der Anteil der DNA-Masse an 6 Mbp langen DNA-Fragmenten liegt in somatischen humanen Zellen nach 60 Gy Röntgenstrahlung bei 9×10^{-8} ($1/1000 \cdot 2100 \cdot 4,3 \times 10^{-8}$).

$$F_k = \frac{k}{n} \cdot r \cdot \frac{r}{n} \cdot \left(1 - \frac{r}{n}\right)^{k-1} \quad (1.8)$$

$$F_k = \frac{k}{n} \cdot r \cdot \frac{r}{n} \cdot e^{-\frac{r \cdot k}{n}} \quad (1.9)$$

F_k – Anteil der DNA-Masse von Fragmenten mit der Länge k ;
 r – induzierte DNA-DSBs; n – Polymer- bzw. Genomlänge; k – Fragmentlänge

Oftmals ist es günstiger sich nicht auf einzelne Fragmentgrößen zu konzentrieren, sondern Fragmentbereiche zu betrachten. Beispielsweise wird im FAR-Assay (*fraction of radioactivity released*) der Anteil der ins Gel eluierten DNA-Masse bestimmt (Rydberg *et al.* 1994; Löbrich 1998), dies entspricht der Summierung aller dsDNA-Fragmente kleiner als eine bestimmte Ausschlussgröße ($= k$), welche von den angelegten elektrophoretischen Bedingungen abhängig ist. Gleichung 1.10 gibt den Anteil der Summe des Molekulargewichts aller Fragmente kleiner k wieder.

$$F_{<k} = \sum_0^k F_k dk = \int_0^k F_k dk = 1 - e^{-\frac{r \cdot k}{n}} \cdot \left(1 + \frac{r \cdot k}{n}\right) \quad (1.10)$$

$$F_{<k} = 1 - e^{-\frac{r \cdot k}{n}} \cdot \left(1 + \frac{r \cdot k}{n} \cdot \left(1 - \frac{k}{n}\right)\right) \quad (1.11)$$

$F_{<k}$ – Fragmentmasse der Fragmente kleiner k ; F_k – Anteil an Fragmenten mit der Länge k ;
 r – induzierte DNA-DSBs; n – Genomlänge; k – Fragmentlänge

Unter Berücksichtigung der Endlichkeit des DNA-Moleküls, der Existenz 2 freier Enden, muss ein Korrekturfaktor eingeführt werden (Gl. 1.11). Für hinreichend klein induzierte Fragmente (hohe Dosis) geht dieser Faktor gegen 1 und spielt in einer Vielzahl von Untersuchungen somit nur eine untergeordnete Rolle. Gleiches gilt für Trennung des Genoms in einzelne Chromosomen, die gesamte Anzahl an freien DNA-Enden spielt bei der Induzierung einer genügenden Anzahl an DNA-DSBs nur eine untergeordnete Rolle. Beispielsweise beläuft sich so der Anteil der DNA-Masse für Fragmente kleiner 6 Mbp bei 2100 induzierten DNA-DSBs auf 62% und unter Berücksichtigung der Teilung des Genoms in Chromosomen auf 63%. Bei einer deutlich geringeren Dosis kann dieser Effekt durchaus eine Rolle spielen. So werden 0,06% der DNA-Fragmente kleiner 6 Mbp sein, wenn 35 stochastisch verteilten DNA-DSBs induziert wurden. Dem gegenüber stehen 2% bei Berücksichtigung der freien Enden der 46 menschlichen Chromosomen.

Ein Problem, dem das Modell keine Rechnung trägt, ist der Anteil der DNA, der auch in unbestrahlten Proben sichtbar ist (Degradation). Diese erkennbaren DNA-Fragmente beruhen hauptsächlich auf präparativen Ursachen oder werden durch apoptotische Zellen hervorgebracht. Für die bestrahlten Reparatur- und Induktionspunkte bedeutet dies, dass die gemessenen Fragmentverteilungen zum einen auf durch Strahlung induzierten DNA-DSBs beruhen aber auch auf Läsionen zurückzuführen sind, die nicht durch ionisierende Strahlung erzeugt wurden. Dieses Problem wurde in der vorliegenden Arbeit dadurch berücksichtigt, dass nur Experimente Eingang fanden in denen keine oder nur sehr geringe Degradationen auftraten. Alternativ hierzu existiert ein mathematischer Ansatz diesen Hintergrund herauszurechnen, das *background-dependent random breakage* Modell, sowie seine Weiterentwicklungen. Hierbei wird die Quantifizierung von DNA-DSBs möglich, welche nur durch Strahlung induziert werden (Pinto *et al.* 2000; Pinto *et al.* 2002; Pinto *et al.* 2004).

1.2.5 Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen und Bystander-Effekte

Die durch ionisierende Strahlungen induzierten DNA-DSBs einer bestrahlten Zelle können zumeist auf den direkten oder indirekten Strahleneffekt zurückgeführt werden. In neueren Studien wird auch in Zellen eine strahlenbedingte Induktion von DNA-DSBs nachgewiesen, die nie einer direkten Bestrahlung ausgesetzt waren (Zhou *et al.* 2000; Österreicher *et al.* 2003; Prise *et al.* 2003; Coates *et al.* 2004; Azzam und Little 2004; Preston 2005b; Belyakov *et al.* 2006; Stenerlöw 2006; Prise *et al.* 2006; Little 2006;

Morgan und Sowa 2007). Dieser strahlenbedingte Bystander-Effekt konnte in Experimenten nachgewiesen werden, in denen das Medium von bestrahlten Zellen auf unbestrahlte Zellen (Bystander-Zellen) übertragen wurde. Womit gezeigt werden konnte, dass primär geschädigten Zellen Faktoren direkt in das Medium abgegeben, welche in benachbarten Zellen zu einer Ausbildung von DNA-DSBs führen können (Mothersill und Seymour 1997; Sokolov *et al.* 2005; Yang *et al.* 2005; Kashino *et al.* 2007). Es ist aber auch gezeigt worden, dass DNA-DSBs in Bystander-Zellen über einen direkten Zell-Zell-Kontakt, durch *gap junctions*, induziert werden können (Azzam *et al.* 1998; Azzam *et al.* 2001; Azzam *et al.* 2003; Mitra und Krishna 2007).

Mittels reparaturdefizienten Zelllinien konnte nachgewiesen werden, dass DNA-DSBs eine größere Bedeutung für die strahleninduzierte Schadensantwort in Bystander-Zellen besitzen als dieses vergleichsweise Basenschäden zugestanden wird. Die Induktion von DNA-DSBs in Bystander-Zellen wurde in einer Reihe an Veröffentlichungen aufgezeigt, wobei die Anzahl der DNA-DSBs zumeist durch Auszählung an immunfluoreszenztechnisch sichtbar gemachten γ -H2AX Foci bestimmt worden ist (Sokolov *et al.* 2005; Yang *et al.* 2005; Burdak-Rothkamm *et al.* 2007; Sedelnikova *et al.* 2007). H2AX wird während der DSB-Reparatur am Serin 139 phosphoryliert, so dass nach einer Fluoreszenzmarkierung der phosphorylierten Form (γ -H2AX) und anschließender Analyse Rückschlüsse auf die Induktion und Reparatur von DNA-DSBs möglich sind (Rogakou *et al.* 2000).

Auch in Bystander-Zellen scheinen die durch Bystander-Effekte hervorgerufenen DNA-DSBs die entscheidenden DNA-Läsionen zu sein, welche den größten Einfluss auf eine Reihe biologischer Endpunkte ausüben. Diese Endpunkte umfassen unter anderem Genmutationen und Chromosomenaberrationen (Morgan 2003a; Morgan 2003b; Mothersill und Seymour 2006), Schwesterchromatidaustausche (Deshpande *et al.* 1996; Lehnert und Goodwin 1997), die Bildung von Mikronuclei (Belyakov *et al.* 2001; Chaudhry 2006) und die Einleitung der Apoptose (Belyakov *et al.* 1999; Belyakov *et al.* 2000).

Neben diesen sich zumeist negativ äußernden Bystander-Effekten wird aber auch von einer „adaptiven Response“ berichtet. So konnte in Bystander-Zellen eine erhöhte Radioresistenz gegenüber unbehandelten Zellen nachgewiesen werden (Iyer und Lehnert 2002a; Iyer und Lehnert 2002b; Shankar *et al.* 2006).

Für den Mechanismus der Bystander-Effekte scheinen vor allem hochreaktive Wasser-Sauerstoffverbindungen eine zentrale Rolle zu spielen (Muroya *et al.* 2006; Burdak-Rothkamm *et al.* 2007; Fournier *et al.* 2007). Zudem scheint der Bystander-Effekt

abhängig vom Zellzyklus zu sein (Sokolov *et al.* 2005; Burdak-Rothkamm *et al.* 2007). Ein Modell, in dem diese Punkte berücksichtigt sind ist in Abbildung 1.11 dargestellt.

Der Zeitraum, in dem ein messbarer Bystander-Effekt anhand eines erhöhten DNA-DSB Level gegenüber dem Hintergrund detektiert worden ist, wird in Abhängigkeit der bestrahlten Zellkulturen unterschiedlich angegeben. So wird davon ausgegangen, dass 48 h bis 72 h nach Bestrahlung das Hintergrund-Niveau an DNA-DSBs in Monolayer-Kulturen (eine Zellschicht) erreicht ist (Sokolov *et al.* 2005; Burdak-Rothkamm *et al.* 2007). In Geweben wird hingegen von bis zu 7 Tagen ausgegangen (Sedelnikova *et al.* 2007).

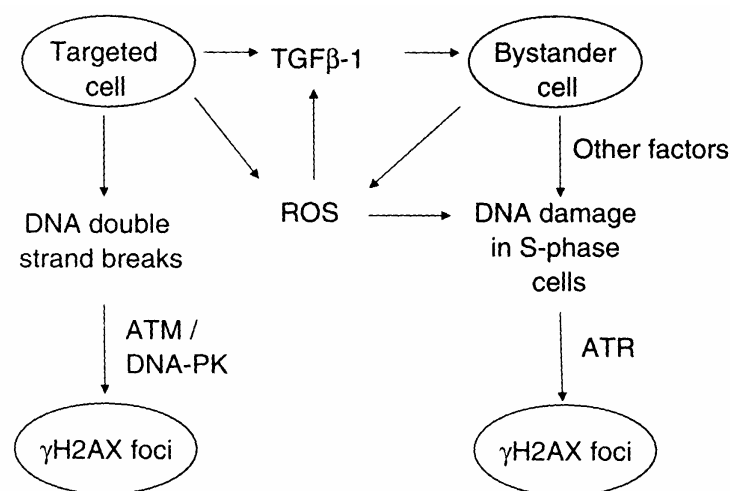


Abb. 1.11: Modell der γ -H2AX Foci Induktion in Bystander-Zellen.

Die Kinasen ATM, DNA-PK und ATR sind bisher bekannt, dazu in der Lage zu sein in Zellen, welche einer direkten Bestrahlung unterlagen, H2AX zu phosphorylieren. Während die Kinasen ATM und DNA-PK bei der Bildung von γ -H2AX Foci in Bystander-Zellen scheinbar keine Rolle spielen, sind Zellen mit einem Defekt im ATR-Gen im Gegensatz zu Zellen mit intakten Genen nicht in der Lage Bystander-Foci auszubilden. Da γ -H2AX Foci durch ATR hauptsächlich während der Replikation in der S-Phase des Zellzyklus gebildet werden, ist es denkbar, dass die Phosphorylierung von H2AX in Bystander-Zellen von der Zellzyklusphase abhängig ist. Als Transmitter zwischen bestrahlten und Bystander-Zellen scheinen vor allem besonders reaktive OH-Verbindungen (ROS – *reactive oxygen species*) in Betracht zu kommen, deren Bildung durch verschiedene Cytokine (z.B.: TGF β -1) zusätzlich angeregt werden kann. (aus Burdak-Rothkamm *et al.* 2007)

1.2.6 Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

Der DNA-DSB ist von vielen verschiedenen Typen der Schädigung des Erbgutes wahrscheinlich die gefährlichste Läsion. DNA-DSBs können durch exogene Agenzien, wie z.B. ionisierende Strahlung und Chemikalien, durch endogene Reaktionen, wie z.B. freie Radikale, oder durch spezielle endogene Mechanismen, wie z.B. die V(D)J

Rekombination während der Reifung der B- und T-Zellen des Immunsystems, erzeugt werden (Abb. 1.12).

Ein Reparaturdefekt oder eine fehlerhafte Reparatur von DNA-DSBs kann zu Mutationen oder zu genomischer Instabilität führen (Vamvakas *et al.* 1997; Richardson und Jasin 2000; Deckbar *et al.* 2007). Die daraus resultierenden genomischen Veränderungen besitzen ein hohes karzinogenes Potential. Andererseits können DNA-DSBs auch zur Einleitung der Apoptose oder zur zellulären Seneszenz führen (Rich *et al.* 2000; Lou und Chen 2006; Engels *et al.* 2007). Daher entwickelte sich in pro- und eukaryontischen Zellen ein komplexes und hoch konserviertes System zur schnellen und effektiven Detektion und Reparatur von DNA-Läsionen (Wood *et al.* 2001; Jackson 2002; Friedberg 2003; Christmann *et al.* 2003; Kruhlak *et al.* 2006; Bowater und Doherty 2006). Eine Störung dieses Systems kann sich in einer Reihe von Krankheiten äußern, deren Auswirkungen sich in einer erhöhten Strahlenempfindlichkeit oder einer erhöhten Tumorrates zeigen (ICRP 2005). Zwei der bekanntesten vererbaren Krankheiten hierbei sind Ataxia-Teleangiectasia (AT) und das Nijmegen-breakage-Syndrom (NBS).

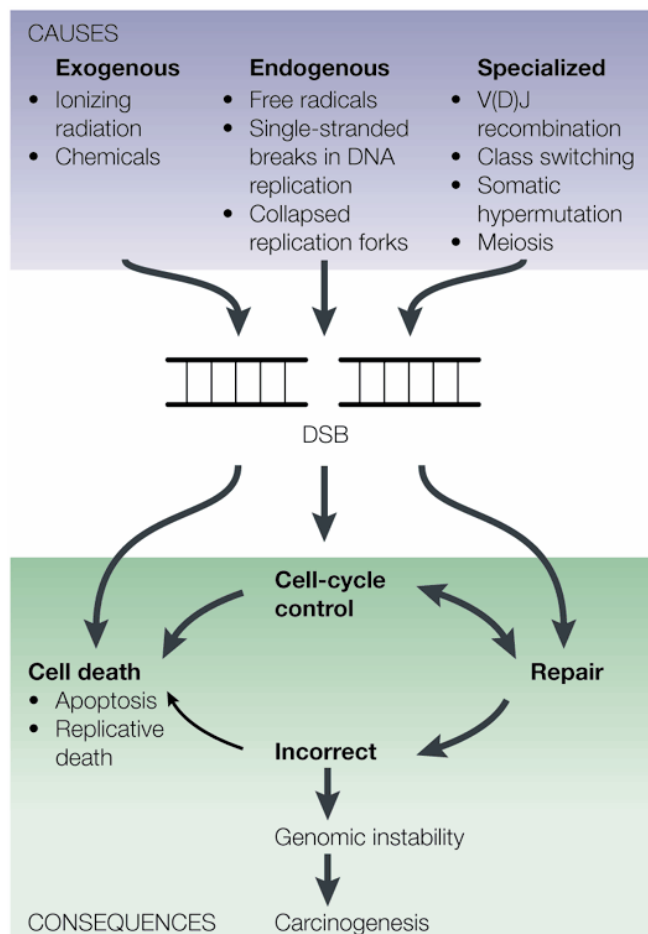


Abb. 1.12: Entstehung, zelluläre Antworten und Folgen von DNA-Doppelstrangbrüchen. (aus van Gent *et al.* 2001)

Patienten, deren ATM-Gen (*Ataxia Teleangiectasia Mutated*) mutiert ist (Savitsky *et al.* 1995a; Savitsky *et al.* 1995b), besitzen einen Defekt der sich sowohl auf die Zellzykluskontrolle und als auch auf die Reparatur von DNA-DSBs auswirkt (Kastan *et al.* 2000; Abraham 2003; Jeggo und Löbrich 2005; Löbrich und Jeggo 2005b; Deckbar *et al.* 2007). NBS ist ein selten auftretendes Chromosomeninstabilitätssyndrom (Maser 2001; Lammens *et al.* 2003), in dem eine Mutation im NBS1-Gen zu einer Beeinflussung der ATM und der ATR (*Ataxia Teleangiectasia Related*) abhängigen DSB-Reparatur führt (Stiff *et al.* 2005). Dies äußert sich unter anderem in einem Knockout der S-Phase-Checkpoints, mit der Folge einer strahlenresistenten DNA-Synthese.

Zur Reparatur von der einzelnen DNA-DSBs stehen Säugerzellen zwei wichtige Reparaturwege zur Verfügung, die homologe Rekombination (HR) und das nicht homologe Endjoining (NHEJ) (van Gent *et al.* 2001; Khanna und Jackson 2001; Jackson 2002). Beide Reparaturwege sind grundsätzlich verschieden. So kann HR in höheren Eukaryonten hauptsächlich nur während der S- und G₂-Phase des Zellzyklus benutzt

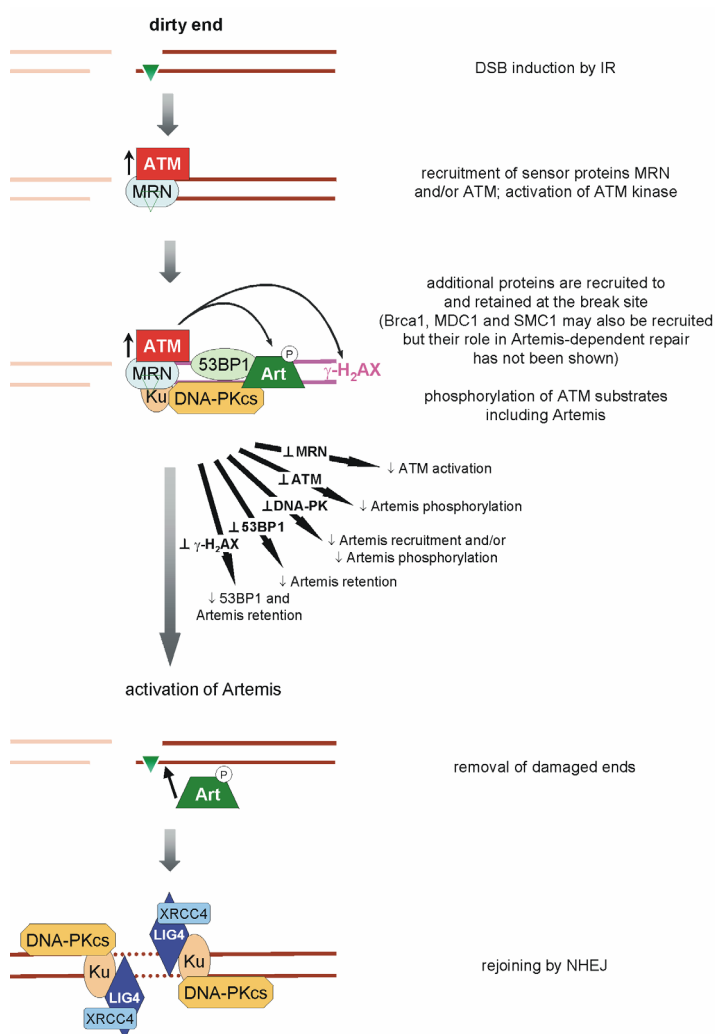


Abb. 1.13: NHEJ-Faktoren für die Prozessierung „einfacher“ (linke Seite) und komplizierter (rechte Seite) DNA-DSBs.

(⊥) Verlust oder Inaktivierung der spezifischen Komponente; (↓) Inhibition der angegebenen Funktion (aus Löbrich und Jeggo 2005a)

werden, da hier die benötigten homologen Sequenzen in ausreichender Nähe vorliegen. Durch einen Abgleich der geschädigten mit den homologen ungeschädigten Genombereichen ist eine nahezu fehlerfreie DSB-Reparatur möglich. Im Gegensatz hierzu stellt das NHEJ eine fehlerbehaftetere DSB-Reparatur dar. Dieser Reparaturweg, der in höheren Eukaryonten dominierend ist, läuft in allen Zellzyklusphasen ab (Rothkamm *et al.* 2001; Rothkamm *et al.* 2003). Hierbei scheint eine einfache Ligation der freien DNA-Enden eines DNA-DSBs stattzufinden.

Je nach Art des generierten DNA-DSB kann dieser sehr schnell repariert werden, wie dies zumeist bei „einfachen“ Brüchen beobachtet wird, oder er unterliegt zunächst einer Prozessierung der freien DNA-Enden, wie dies bei komplizierteren Brüchen der Fall zu sein scheint (Abb. 1.13). Durch diese Prozessierung kann es zu einer Verlangsamung der Reparatur bis hin zu einer Arretierung der Zellen an Zellzyklus-Checkpoints kommen (Riballo *et al.* 2004; Löbrich und Jeggo 2005a; Jeggo und Löbrich 2005).

Experimente mit unterschiedlichen Strahlenarten in menschlichen G_0/G_1 -Zellen, in welchen die Reparatur der DNA-DSBs hauptsächlich über das NHEJ stattfindet, zeigen DSB-Reparaturkinetiken, welche aus zwei Phasen bestehen: einer ersten schnellen Phase und einer zweiten langsamen Phase. Dieses zweiphasige Modell kann durch verschiedene biologische Mechanismen erklärt werden. Eine Möglichkeit der DSB-Reparatur geht von zwei getrennten enzymatischen Prozessen aus (Tseng und Hsu 1990), während eine zweite Möglichkeit eine Sättigung des DSB-Reparatursystems zugrund liegt (Goodhead 1985; Wheeler und Nelson 1991). Ein drittes moderneres Modell geht hingegen von einer Trennung der induzierten DNA-DSBs in „einfache“ und komplexe Brüche aus, welche jeweils ihre eigenen Reparaturcharakteristiken haben (Stewart 2001; Riballo *et al.* 2004).

Dem dritten Modell folgend müsste somit die DSB-Reparatur von der verwendeten Strahlenart abhängig sein. So besitzen dicht ionisierende Strahlenarten aufgrund ihrer hohen Ionisationsdichte eine größere Wahrscheinlichkeit einen komplexen Bruch zu generieren als beispielsweise die dünn ionisierende Röntgenstrahlung. Da die erste Reparaturphase weitestgehend unabhängig von der Strahlenart zu sein scheint, ist es wahrscheinlich, dass während dieser Zeit hauptsächlich „einfache“ DNA-DSBs repariert werden. Im Gegensatz zur schnellen Reparaturkomponente zeigt die langsamere zweite Phase eine Abhängigkeit vom LET der Strahlenart. So benötigt eine Zelle mehr Zeit zur Reparatur der DNA-DSBs, je höher der LET der Strahlenart ist (Abb. 1.14) (Stenerlöv *et al.* 2000, Höglund und Stenerlöv 2001).

Dieses Verhalten der langsameren Reparatur in Abhängigkeit des LET kann auf verschiedene Faktoren zurückgeführt werden. So werden die induzierten DNA-DSBs mit Zunahme der Ionisationsdichte immer komplexer. Das Reparaturverhalten könnte aber auch die Größe der generierten dsDNA-Fragmente abhängig sein. Da bei hohem LET vermehrt kleine Fragmente entstehen, ist es möglich, dass diese von der Bruchstelle weg diffundieren. Damit würde sich die Reparatur selbst bei einfachen Brüchen komplizierter gestalten. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass die Chromatinorganisation selbst einen Einfluss auf die Reparatur der DNA-DSBs ausübt. So sollten DNA-DSBs schneller repariert werden, wenn sie sich an strukturell günstigen Stellen befinden, Stellen, an denen Reparaturproteine schnell und problemlos mit dem geschädigten Molekül interagieren können. DNA-DSBs in schwer zugänglichen Bereichen sollten hingegen langsamer repariert werden (Smerdon und Thoma 1990; Ahnström *et al.* 2000). Höher geordnete Chromatinstrukturen könnten die DSB-Reparatur auch auf anderem Weg beeinflussen. So könnten strukturell bedingt nahe beieinander liegende DNA-DSBs, wie an den *loop-attachement-points* des Loop-Rückrates, bei der Reparatur voneinander profitieren. Dies setzt voraus, dass sich die Reparatur aneinander liegender DNA-DSBs positiv beeinflusst und nicht ein DNA-DSB ein vollkommen unabhängiges Reparaturereignis darstellt.

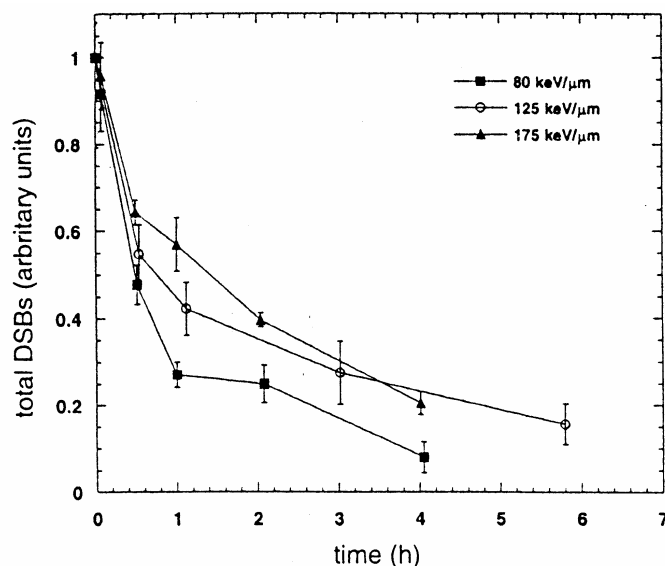


Abb. 1.14: Anzahl der DNA-DSBs je Basenpaar als Funktion der Reparaturzeit.

Gemessen wurden dsDNA-Fragmente größer 500 kbp nach Bestrahlung mit Stickstoff-Ionen. Die Dosen wurden so gewählt, dass die bestrahlten Zellen die gleiche Anzahl an Teilchendurchtritten erlitten haben. (aus Höglund und Stenerlöv 2001)

1.3 Ziele der Arbeit

1.3.1 Untersuchung zur Aufklärung der tertiären Chromatinstruktur

Wie in Kapitel 1.2.1 beschrieben konnte mittels ionisierender Strahlung die Anordnung der Nukleosomen innerhalb der 30 nm Chromatinfaser aufgeklärt werden (Rydberg *et al.* 1998a). Im Gegensatz zu dieser sekundären Strukturebene des Chromatins ist in lebenden Zellen die tertiäre DNA-Organisation noch weitestgehend unbekannt. Zwar existieren einige Modelle, wie z.B. das Chromonema, das *random-walk/giant-loop* oder das *multi-loop-subcompartment* Modell, die versuchen diese Strukturen zu beschreiben, allerdings beruhen diese Modelle auf Methoden, welche eine Zerstörung der nativen Struktur des Chromatins erfordern. Daher sind für das Verständnis des Zusammenhangs zwischen den strukturellen und funktionellen Eigenschaften des Chromatins weitergehende Untersuchungen der höher geordneten Chromatinorganisationen in lebenden Zellen notwendig. Hierzu soll diese Arbeit einen Beitrag leisten.

Die benutzte Methode zur Detektion der tertiären Chromatinstrukturen in lebenden Zellen beruhte auf einem qualitativen und quantitativen Vergleich der unterschiedlichen dsDNA-Fragmentverteilungen, welche durch verschieden dicht ionisierende Strahlenarten generiert wurden. Anhand dieser Verteilungen sollte die Größe der Tertiärstruktur des Chromatins während der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus ermittelt werden. Der nächste Schritt befasste sich damit, inwiefern die Organisation des Chromatins von der Kondensation desselben beeinflusst wird. Hierbei ist zum einen untersucht worden, welchen Einfluss die starke Kondensation des Chromatins während der Mitose auf die Tertiärstruktur des Chromatins ausübt. Zum anderen ist untersucht worden, ob die Tertiärstruktur aufgrund unterschiedlicher Funktionalitätszustände der DNA einer möglichen intragenomischen Varianz unterliegt.

Auf Grundlage der erhaltenen dsDNA-Fragmentverteilungen sollte zusätzlich ein Modell verfeinert werden, das sowohl in Abhängigkeit von den physikalischen Strahlenparametern, als auch von den biologisch bedingten Einflüssen der Chromatinstrukturen die Generierung dieser dsDNA-Fragmente versucht zu beschreiben.

1.3.2 Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus

Neben der Induktion von DNA-DSBs durch ionisierende Strahlung ist deren Reparatur ebenfalls von Bedeutung, da diese einen entscheidenden Einfluss auf die Teilungsfähigkeit und das Überleben der Zellen ausübt. Daher sollte geklärt werden, ob die Organisation des Chromatins einen nachweisbaren Einfluss auf die Reparatur der induzierten DNA-DSBs besitzt. So wurden Experimente mit verschiedenen niederenergetischen schweren Ionen ($< 11 \text{ MeV/u}$) durchgeführt. Anhand der erhaltenen dsDNA-Fragmentverteilungen konnte der Einfluss der Chromatinstruktur auf die DSB-Reparatur untersucht werden. Dabei sollte die DSB-Reparatur in Abhängigkeit von der Größe der generierten Fragmente und in Abhängigkeit von der direkten Nachbarschaft weiterer induzierter DNA-DSBs beobachtet werden.

Auch konnte durch Verwendung eines Fluoreszenzmarkers (γ -H2AX) die Reparatur eines einzelnen DNA-DSB bzw. der DNA-DSBs einzelner Teilchenbahnen verfolgt werden. Mittels dieser Methode sollte herausgefunden werden, wie die Initiierung der DSB-Reparatur in bestrahlten Zellen während der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus erfolgt. Ist diese Initiierung abhängig von der applizierten Dosis oder ist eine Schädigung der benachbarten Zellen ebenso von Bedeutung? In diesem Zusammenhang sollte zusätzlich ein Beitrag dazu geleistet werden, inwiefern DNA-DSBs in unbestrahlten Zellen während der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus durch Bystander-Effekte induziert werden können.

2. Material und Methoden

2.1. Zell- und molekularbiologische Methoden

2.1.1 Zellkultur und Zelllinien

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene humane Zelllinien verwendet, eine primäre Fibroblastenlinie (MRC-5) und eine Tumorzelllinie (MGH-U1). Beide Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO₂ in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre in „Minimum Essential Medium“ - Eagle (Biochrom AG), 10% fötalem Kälberserum (FCS) (Biochrom AG), 1% nichtessentielle Aminosäuren (100x) (Biochrom AG) und 1% Penicillin-Streptomycin (10 000 units; 10 000 µg/ml) (Biochrom AG) kultiviert. Die Proliferationsrate und die Lebensspanne der Zellen sind abhängig von der verwendeten Zelllinie (Hayflick und Moorhead 1961). Durch Waschen mit *phosphat buffered saline* (PBS) (PBS Dulbecco; Biochrom AG) und anschließendem Ablösen der Zellen vom Boden der Kulturflaschen mittels Trypsin-EDTA (0,25% Trypsin; 0,02% EDTA in PBS) (Biochrom AG) konnten diese subkultiviert werden.

MRC-5:

Diese Zelllinie stammt aus dem primären Lungengewebe eines 14 Wochen alten männlichen menschlichen Fötus (Jacobs *et al.* 1970). Bezogen wurden die Linie von der *European Collection of animal cell cultures* (ECACC) in zwei Chargen mit den Referenznummern 97112601 und 84101801. Die erste Charge kam zumeist bei allen Experimenten zur Messung der Induktion von dsDNA-Fragmenten zum Einsatz. Die Zweite wurden zur Quantifizierung von DNA-DSBs durch einen Fluoreszenz-Markierten Antikörper gegen ein Reparaturmarkerprotein, H2AX (Rogakou *et al.* 1999; Rothkamm und Löbrich 2003) verwendet. Die Verdopplungszeit von MRC-5 Zellen lag bei 3-4 Tagen, daher konnten sie einmal pro Woche in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:5 gesplittet werden.

Im konfluenten Zustand lag die Zelldichte zwischen 4×10^4 und 7×10^4 Zelle/cm². In diesem Zustand wird das Wachstum der Zellen durch Zell-Zell-Kontakt inhibiert. Dadurch arretieren die Zellen als Zellmonolayer in der G₁/G₀-Phase des Zellzyklus.

MGH-U1:

Bezogen wurde diese Zelllinie von S. Powell (Boston (MA), USA). MGH-U1 Zellen (ECACC-RefNr.: 85061108) entstammen einem Blasenkarzinom eines humanen männlichen Probanden, besitzen epitheliale Eigenschaften und einen hypertriploiden bis hypertetraploiden Chromosomensatz (Kato *et al.* 1977, Kato *et al.* 1978). Die Proliferationsrate betrug ca. 14 h bis 16 h, so dass eine Subkultivierung zweimal pro Woche in einer Splitrate bis 1:20 durchgeführt werden konnte. Eingesetzt wurde diese Zelllinie zur Untersuchung der Induktion von dsDNA-Fragmenten in mitotisch angereicherten bzw. in exponentiell wachsenden Zellen. Die Zelldichte schwankte von Experiment zu Experiment zwischen 4×10^4 und $1,5 \times 10^5$ Zellen/cm².

2.1.2 Isolierung genomischer DNA und Elektrophorese

Die Induktionspunkte wurden direkt nach der Bestrahlung aufgearbeitet. Diese Proben beinhalten noch alle durch die Strahlung verursachten DNA-Schäden. Reparaturpunkte, Proben, denen Zeit zur Behebung der induzierten DNA-Läsionen gewährt wurde, wurden entsprechend ihrer Reparaturzeiten aufgearbeitet.

Der erste Schritt der Aufarbeitung bestand darin die Zellen von ihrem Untergrund abzulösen. Dazu wurden die Proben mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend trypsiniert. Die Trypsinierung der Zellen erfolgte bei 4°C durch eine 10 bis 20minütige Behandlung mit Trypsin-EDTA. Nach Zugabe eiskalten Mediums, welches die Wirkung des Trypsins unterbindet, wurde mittels einer Thomakammer die Zelldichte bestimmt und die Zellsuspension bei 4°C und 300xg 9 min zentrifugiert (Eppendorf centrifuge 5804 R; Eppendorf). Nach Verwerfen des Überstandes und der Resuspendierung des Zellpellets in eiskaltem PBS mit einer Konzentration von $1,25 \times 10^7$ Zellen/ml und direkt nachfolgender Zugabe des gleichen Volumens an 1,6%iger und 42°C warmer *low melting temperature* Agarose (Type VII, Sigma) wurde das Zellsuspensiat in 80µl-Blöckchenformer (BIO-RAD) pipettiert. Dies entspricht einer Endkonzentration von 5×10^5 Zellen je Blöckchen. Nach weiteren 10 min bei 4°C sind die Agaroseblöckchen erstarrt und konnten anschließend ebenfalls bei 4°C für mindestens 30 min in Lysepuffer (0,5 M EDTA (pH 8), 1% (w/v) *sodium lauroyl sarcosine* (Merck) und 1 mg/ml Pronase E (Merck)) äquilibriert werden. Danach erfolgte für die Dauer von 40 h und einer Temperatur von 50°C die Lyse der Zellen, in der diese aufgeschlossen und die DNA vollständig von Proteinen befreit wurde. Nach erfolgter Lyse wurden die

Agaroseblöckchen in 0,5 M EDTA eingebettet, wodurch die DNA mehrere Monate ohne nennenswerte Degradation konserviert werden konnte.

Bei Bestrahlungen mit dicht ionisierenden Teilchen an der Gesellschaft für Schwerionenforschung (GSI) in Darmstadt sind aufgrund veränderter Strahlungsbedingungen zwei zusätzliche Bearbeitungsschritte zur Isolierung der bestrahlten genomischen DNA notwendig geworden. So beruhte ein Arbeitsschritt auf der senkrechten Lage der Petrischalen während der Bestrahlung. In dieser Lage sammelt sich ein Resttropfen PBS in der unteren Hälfte der Petrischale. Dieser absorbiert sämtliche ionisierende Teilchen, womit keine homogene Dosisverteilung des zu untersuchenden Zellmonolayers gegeben ist (Abb. 2.1B). Daher musste vor der Trypsinierung der unbestrahlte Teil der Zellen durch ein Wattestäbchen herausgewischt werden. Der zweite zusätzliche Arbeitsschritt bestand in einem Poolen der trypsinierten Zellen von mindestens 8 (MRC-5) bzw. 5 (MGH-U1) Petrischalen für einen einzelnen Messpunkt. Dieses Poolen ist für die Einstellung der gewünschten DNA-Konzentration der Agaroseblöckchen notwendig gewesen, da in der Regel auf einer einzelnen Petrischale nicht genügend Zellen wuchsen. Zugleich gewährleistete dies eine homogene Verteilung der trypsinierten Zellen über mehrere Agaroseblöckchen.

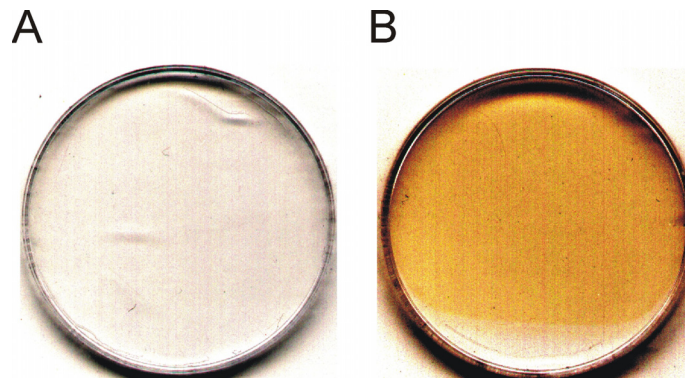


Abb. 2.1: Homogene Verteilung der Teilchenbahnen nach Bestrahlung mit hoch-LET Teilchen an der GSI in Darmstadt.

(A) Unbestrahlte Probe. (B) Petrischale (Ø 35 mm) mit 8300 Gy ^{70}Zn -Ionen (1340 T/100 μm^2 ; 3880 keV/ μm) bestrahlt. Bei sehr schweren Teilchen kann eine Aufaktivierung des Kunststoffbodens der Petrischalen erfolgen, wodurch eine Verfärbung des Kunststoffs eintritt (gelblich). Gut erkennbar ist die Homogenität der bestrahlten Fläche. Ebenso ist der Resttropfen PBS sehr gut sichtbar, welcher durch die Teilchenstrahlung nicht durchdrungen werden kann.

Die Separierung doppelsträngiger DNA-Fragmente erfolgte mittels PFGE (CHEF DRII + CHEF DRIII System, BIO-RAD) (Contopoulou *et al.* 1987; Blöcher *et al.* 1989; Elia und Nichols 1993; Löbrich *et al.* 1993). Die Agaroseblöckchen wurden in ein 0,8%iges Agarosegel (*high strength analytical grade* Agarose, BIO-RAD) eingesetzt und durch *low melt* Agarose (0,8%) (Biozym) die Geltaschen verschlossen. Nach 60 min Äquilibration

im Laufpuffer (0,5 x Tris-Borat-EDTA (TBE)) erfolgte die Auftrennung der dsDNA-Fragmente. Um eine optimale Trennung der Fragmente zwischen 20 kbp und 3 Mbp zu gewährleisten, wurden zwei verschiedene Elektrophoreseprotokolle gewählt. Zu Beginn dieser Arbeit wurden allerdings drei verschiedene Elektrophoresebedingungen verwendet. Im Laufe dieser Arbeit stellte sich heraus, dass für die Analyse der dsDNA-Fragmentverteilungen mit zwei unterschiedlichen Elektrophoreseprotokollen eine ausreichende Auftrennung der DNA gewährleistet wird. Es erfolgte lediglich eine geringfügige Anpassung des Protokolls für kleine Fragmente. In Tabelle 2.1 sind alle Laufbedingungen aufgeführt, wobei für kleinere Fragmente zwei Einstellungen dargestellt sind (zu Beginn der Arbeit: 20 – 400 kbp; angepasst: 20 – 500 kbp). Zur Bestimmung des Molekulargewichtes sind die Längenstandards *Hansenula wingei* (BIO-RAD) und *Low Range PFG Marker* (NEB) verwendet worden.

Nach Ablauf der Elektrophorese wurden die Agarosegele über Nacht in einem Ethidiumbromid-TBE-Bad (1:10000) gefärbt (Vardevanyan *et al.* 2001; Vardevanyan *et al.* 2003). Anschließend konnte durch ca. 1 h Waschen in 0,5 x TBE – Puffer der unspezifische Ethidiumbromid-Hintergrund entfärbt werden. Mit einem digitalen Kamerasystem, das an ein Aufnahmeprogramm gekoppelt ist (ISIS – *in situ imaging system*, MetaSystems GmbH), wurden die Gele bei 312 nm auf einem UV-Tisch (UV-Transilluminator, Biometra®) fotografiert.

Tabelle 2.1: PFGE-Protokolle.

Fragment-Größenbereich	20 - 400 kbp	20 - 500 kbp	200 - 3000 kbp
Laufzeit	18 h	13 h	60 h
Temperatur	14°C	16°C	16°C
Elektrische Feldstärke	4,5 V/cm	6 V/cm	6 V/cm
Pulszeiten ^a	20 s auf 50 s	1 s auf 30 s	40 s auf 800 s
Feldwinkel	120°	120°	120°

^a – Die Pulszeiten wurden als lineare Rampe programmiert.

2.1.3 Southern-Hybridisierung mit regionenspezifischen DNA-Sonden

Zur Untersuchung der DSB-Induktion in verschiedenen genomischen Bereichen wurde eine Southern-Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden durchgeführt. Hierzu musste die elektrophoretisch separierte DNA auf eine positiv geladene Nylon-Membran (Hybond XL, amersham pharmacia biotech UK limited) übertragen werden.

Zunächst wurde die DNA über 15 min durch 0,25 M Salzsäure bei einem angelegten Unterdruck von 70 mbar (Vakuumbloetter; Biometra®) depuriniert. Durch 0,5 M Natronlauge wurde die DNA anschließend denaturiert und über 90 min ebenfalls bei einem angelegten Unterdruck von 70 mbar auf die positiv geladene Nylon-Membran übertragen. Nachdem die DNA transferiert wurde, ist die DNA-tragende Membran in 2 x *standard saline citrat* (SSC) gewaschen und in Frischhaltefolie eingewickelt worden.

Durch diese Bearbeitung konnten die in der PFGE aufgetrennten dsDNA-Fragmente bei 4°C langfristig gelagert werden, wobei die Dauer der Lagerung der Membranen die Qualität der Southern-Hybridisierungen nicht beeinflusste.

Zu Beginn der Southern-Hybridisierungen wurde eine Vorhybridisierung durchgeführt. Diese diente der Absättigung des unspezifischen Hintergrundes der Nylon-Membranen. Mit einer Geschwindigkeit von 8 Umdrehungen pro Minute wurden die in Hybridisierungsflaschen übertragenen Membranen 6 Stunden bei 54°C in 18 ml Hybridisierungspuffer (5 x SSPE (20x SSPE bestehend aus 3 M NaCl, 0,2 M NaH₂PO₄, 20 mM Na₂EDTA (pH 7,4)), 5 x Denhardts, 3% SDS, 50% Formamid) mit 300 µl Heringsspermien-DNA (DNA MB grade, Roche diagnostics GmbH) inkubiert. Nach dieser Vorhybridisierung wurde durch Zugabe der ³²P-markierten DNA-Sonden die sondenspezifische Hybridisierung gestartet. Nachdem diese über Nacht abgeschlossen war, wurden die Membranen bei 65°C in mehreren Schritten gewaschen. Der Ablauf der Prozedur umfasste ein einmaliges Spülen für 5 min mit 40 ml Waschpuffer 1 (2 x SSPE, 0,1 x SDS), anschließend zweimaligen 20minütigen Waschen mit 80 ml des gleichen Puffers, danach jeweils mit 80 ml für 20 min einmal mit Waschpuffer 2 (1 x SSPE, 0,1 x SDS) und zweimal mit Waschpuffer 3 (1 x SDS, 1 mM EDTA, 40 mM Na²PO₄). Nach dem letzten Waschschrift wurden die markierten Membranen wieder in 2 x SSC eingelegt und anschließend in Kunststoffolie eingeschweißt.

In Abhängigkeit von der verwendeten Sonde kann dieses Protokoll entsprechend variieren (Rose 2002). So wurde die single-copy Sonde D21S1 bei 65°C statt 54°C und mit Milli-Q Wasser statt Formamid hybridisiert.

Durch 20 min Spülen (Drehgeschwindigkeit der Hybridisierungsflaschen 8 rpm) mit 0,4 M Natronlauge bei Raumtemperatur konnten die auf die Membranen hybridisierten Sonden wieder herunter gewaschen werden (strippen). Danach mussten die Membranen mindestens 20 min Neutralisiert (0,1 x SSC, 0,1 x SDS, 0,2 M Tris-HCl) werden. Anschließend standen diese einer erneuten Southern-Hybridisierung mit weiteren spezifischen DNA-Sonden zur Verfügung.

Für die Markierung der regionspezifischen DNA-Sonden wurde das *Rediprime™ II Random Labelling* System (Amersham Biosciences UK limited) verwendet. Durch Zugabe von 25 ng der jeweiligen Sonde und 6-7 µl Aktivität (10 µCi/µl) (^{32}P -Nukleotide, Amersham Biosciences UK limited) ist die Markierung der Sonden gestartet worden. Nach 2 h bei 37°C bzw. 16 h bei Raumtemperatur konnte das Sondengemisch über ein Säulensystem (MobiSpin S-200, MoBiTec GmbH) aufgereinigt und dem Hybridisierungsansatz zugegeben werden.

Zur Messung der Fragmentverteilungen wurden die eingeschweißten radioaktiv markierten Membranen in Abhängigkeit von ihrer Aktivität einige Stunden bis hin zu 14 Tagen in einem Bleibunker auf spezielle Screens aufgelegt. Das Auslesen dieser Screens erfolgte durch ein Phosphor-Imager-System (cyclon storage phosphor imager, Packard Instruments Co.) mit der zugehörigen Software (OptiQuant, Packard Instruments Co.).

In dieser Arbeit wurden insgesamt drei verschiedene etablierte DNA-Sonden zur Southern-Hybridisierung eingesetzt. Ein vierter Ansatz (genomische Sonde), DNA isoliert aus MGH-U1 Zellen (QIAamp®DNA Mini Kit, Qiagen), markierte das gesamte Genom. Diese vierte Markierung gleicht in Bezug auf den markierten Teil der DNA zwar einer Ethidiumbromidfärbung besitzt dieser gegenüber aber eine bedeutend höhere Sensitivität.

Die „single-copy“-Sonde D21S1, deren Bindungsstelle sich auf dem proximalen Teil des p-Arms von Chromosom 21 innerhalb einer dunklen Giemsa-Bande befindet (Hattori *et al.* 2000), spiegelt eine durchschnittliche DNA-Region wieder.

Die Zentromer-spezifische Sonde D21Z1 (ATCC-Nummer: 61392) bindet an einen Bereich mit heterochromatisch repetitivem Charakter dar. Da sich die Zentromerregionen der einzelnen Chromosomen sehr ähnlich sind, erfolgt die Hybridisierung dieser Sonde an mehrere Bindungsstellen, die jedoch denselben strukturellen Charakter besitzen (Rief und Löbrich 2002).

Wie D21Z1 besitzt die letzte Sonde 18s-rDNA (*Resource Center/ Primary Data of the german human Genome Projekt* - Nr.: IMAGp998L23325) ebenfalls mehrere Hybridisierungsstellen markiert aber einen euchromatischen repetitiven Bereich.

Die Herstellung der Sonden erfolgte durch Expression spezifischer Plasmide in einem kompetenten *Escherichia coli*-Stamm (*E. coli* BL21, Amersham Pharmacia Biotech), der anschließenden Plasmidisolierung (QIAGEN Plasmid Midi Kit, Qiagen), einem Restriktionsverdau (siehe Tab. 2.2) und einer Elektrophorese mit nachfolgender Aufreinigung der ausgeschnittenen DNA-Sonden (QIAEX II Gel Extraction Kit, Qiagen).

Tabelle 2.2: Merkmale der Regionenspezifischen DNA-Sonden.

	D21S1	D21Z1	18s-rDNA
Vektoren (Plasmidgröße)	pBR328 (4900 kbp)	pKUN1 (4000 kbp)	pT7T3D-Pac
Restriktionsenzyme	<i>EcoRI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>NotI</i> + <i>EcoRI</i>
Sondengröße	1600 kbp	850 kbp	299 kbp
Spezifische Bindungsstellen in MRC-5 Zellen	Chromosom 21; <i>NotI</i> -Restriktionsfragment ^a (3,2 Mbp)	mehrere Chromosomen (besonders 13 und 21); <i>HindIII</i> -Restriktionsfragmente ^a (einige hundert kbp bis wenige Mbp)	mehrere Chromosomen; <i>EcoRV</i> -Restriktionsfragmente ^a (einige hundert kbp bis wenige Mbp)

^a – Die Restriktionsfragmente ergeben sich durch einen Verdau der DNA aus MRC-5 Zellen.

2.1.4 γ -H2AX – Immunfluoreszenzfärbung

Die direkte Messung einzelner DNA-DSBs, induziert durch dünn ionisierende Strahlungen, in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus wird durch den Nachweis der Phosphorylierung des Serins 139 des Histons H2AX durch Immunfluoreszenzfärbung ermöglicht (Rogakou *et al.* 2000; Rothkamm und Löbrich 2003).

Die Immunfluoreszenzfärbung beginnt mit einer 15minütigen Fixierung von MRC-5 Zellen auf dem jeweiligen strahlungsbedingten Untergrund (Deckgläschen, Mylarfolie) durch PBS + 2% Formaldehyd (Roth). Nach 3 x 10 min Waschen mit PBS erfolgte eine Permeabilisierung der Zellen durch 0,2% eiskaltes Triton X-100 (Roth) in PBS + 1% FCS. Anschließend wurden die zellulären Monolayer 3 x je 10 min mit PBS + 1% FCS gewaschen. Danach ist der primäre Antikörper (Anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139), clone JBW301, 0,7 µg/µl; upstate-biomol), der zuvor 1:200 in PBS + 1% FCS verdünnt wurde, 90 min lang auf die Proben gegeben worden. Nach weiteren 3 Waschschritten in PBS + 1% FCS erfolgte eine 90minütige Inkubation des monoklonalen sekundären Antikörpers (1:500 in PBS + 1% FCS verdünnt) (Alexa Fluor®488 goat anti-mouse IgG (H+L), 2mg/ml; Molecular Probes). Nachdem die letzten Waschschriffe, 3 x 10 min in PBS, beendet worden sind, wurden die Zellen mit Mounting-Medium mit 4,6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) (vectashield H-1000; Vector Laboratories) überschichtet.

Zum Abschluss der Färbung wurden die Deckgläschen auf einen Objektträger gelegt und anschließend mit Nagellack versiegelt. Die Lagerung der Präparate erfolgte bei 4°C, wobei das Fluoreszenzsignal der Färbung mit Dauer der Lagerung rapide abnahm, so dass die Auswertung der Präparate innerhalb von 7 Tagen erfolgen musste.

Die Auswertung, die Zählung der γ -H2AX Foci pro Zellkern, erfolgte bei 1000facher Vergrößerung direkt am Fluoreszenzmikroskop (Axioskop2; Zeiss). Zusätzlich konnten Bilder der Färbungen mit einer digitalen Kamera und der gekoppelten Software (ISIS) aufgenommen werden. Für die Färbungen wurden folgende Filtersätze verwendet: Fluoreszenzfärbungen durch DAPI (markieren die gesamte DNA) wurden mit einem Anregungsfilter D 360/50, einem Beamsplitter 400DCLP und einem Breitpass-Emissionsfilter gemessen. γ -H2AX Foci wurden durch einen FITC-Filtersatz (HQ 480/40; Q507LP; HQ 535/50) detektiert. In jedem Präparat wurden hierbei mindestens 40 Zellen mit insgesamt mindestens 40 γ -H2AX Foci gezählt, wodurch sich ein repräsentativer Wert für die mittlere Anzahl an γ -H2AX Foci pro Zellkern ergibt.

In Abhängigkeit von der Strahlenart musste die Handhabung der bestrahlten Proben variiert werden. So fanden α -Bestrahlungen der Zellen auf Mylarfolie statt (siehe Kapitel 2.2.2), welche auf Kunststoffringe gespannt worden war. Vor Zugabe des primären Antikörpers ist die zelltragende Folie auf kleinere, ca. 1 cm durchmessende Edelstahl-Teflonringe übertragen worden. Nach Ablauf der Färbung, wie zuvor beschrieben, wurde die Folie aus diesen kleinen Ringen herausgeschnitten, auf einen Objektträger gegeben und mit einem großen Deckgläschen fixiert. Des Weiteren wurde das Protokoll der Immunfluoreszenzfärbung in Bezug auf die DAPI-Färbung geändert. So fand diese durch eine 3minütige Inkubation der Präparate in DAPI-PBS (0,2 μ g/ml), nachfolgendem 5minütigen Waschen in PBS und der Zugabe von Mounting-Medium ohne DAPI statt.

2.2 Bestrahlungen

2.2.1 Röntgenbestrahlung

Aufgrund unterschiedlicher experimenteller Anforderungen wurden zwei verschiedene Röntgenröhren zur Bestrahlung der Zellen benutzt. Experimente zur Detektion doppelsträngiger DNA-Fragmente mittels PFGE wurden an einer Röntgenröhre des Typs

PW2 184/00 (Philips) mit Wolframanode und Beryllium-Austrittsfenster, sowie 1 mm Aluminiumfilterung durchgeführt. Bei einer angelegten Beschleunigungsspannung von 95 kV, sowie einem Heizstrom von 25 mA wurde eine Dosisleistung von 5,5 Gy/min in 20 cm Entfernung vom Austrittsfenster erreicht. Experimente, die der DSB-Quantifizierung mittels Immunfluoreszenzfärbung von γ -H2AX dienten, wurden an einer Röntgenröhre des Typs MCN 165/796704 (Philips) ausgeführt. Diese Röhre besitzt ebenfalls eine Wolframanode und ein Beryllium-Austrittsfenster. Die Proben wurden in einer Entfernung von 60 cm vom Austrittsfenster bestrahlt, bei 1 mm Aluminium-Filterung, 6 mA und 90 kV entsprach dies einer Dosisleistung von 70 mGy/min, bei 13 mm Aluminium-Filterung von 8,5 mGy/min. Durch regelmäßige chemische Dosimetrie (Fricke und Hart 1966; Severin *et al.* 2005) wurden die Dosisleistung und die Homogenität des Bestrahlungsfeldes kontrolliert.

Zur Unterbindung von Reparaturprozessen erfolgte die Bestrahlung der Zellen bei 4°C. Hierzu wurde das Kulturmedium aus den Zellkulturflaschen abgesaugt und gegen eiskaltes PBS ausgetauscht. Um eine konstant niedrige Temperatur aller Proben zu gewährleisten, variierte die Menge des benutzten PBS je nach Bestrahlungsdauer. Bei extrem hohen Dosen (250 Gy entspr. 45 min Bestrahlung) erfolgte eine zusätzliche Kühlung der Zellen mittels eines handelsüblichen Kühlakkumulators, der auf die Kulturflasche aufgelegt wurde. Nachdem die Bestrahlung der Zellen abgeschlossen war, wurden diese anschließend sofort aufgearbeitet (Induktionspunkte) bzw. zur Ermittlung von Reparaturkinetiken in ihrem ursprünglichen Medium bei 37°C und 5% CO₂ in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre zur Reparatur inkubiert.

2.2.2 α -Bestrahlungen

Als Strahlungsquelle diente ein ²⁴¹Americium-Flächenstrahler (Amersham-Buchler, Braunschweig) mit einer aktiven Fläche von 195 mm x 80 mm und einer Aktivität von 48 MBq. Americium hat eine Halbwertszeit von 432,2 Jahren und emittiert neben α -Teilchen, mit einer mittleren Energie von 5,48 MeV (ICRU, 1984), auch einen für die durchgeführten biologischen Versuche vernachlässigbaren Anteil an γ -Strahlung. Die aktive Schicht wurde als Americium-Oxid in eine Silberschicht eingewalzt, die wiederum mit einer 2 μ m dicken Gold-Palladium-Legierung versiegelt wurde. Die dosimetrische Fluenzbestimmung wurde am Strahlenzentrum Gießen mittels eines Ätzverfahrens an Kernspurdetektoren (CR39-Plättchen) durchgeführt. Durch dieses Verfahren konnte die

mittlere Energie auf das Target (3,66 MeV) berechnet, der mittlere lineare Energietransfer (114,7 keV/ μm) ermittelt und die Fluenzrate ($7,88 \cdot 10^4$ Teilchen $\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) gemessen werden. Daraus folgt eine Dosisleistung von 0,87 Gy/min (Pross 1997) bei folgendem Aufbau: Die Americium-Quelle ist von einer 1 mm hohen Aluminiumschiene umgeben, auf dieser werden wiederum 2 mm dicke Abstandshalter aufgelegt, die die zu bestrahlenden Proben tragen. Das heißt, die unkollimierten α -Teilchen müssen 3 mm Luft, sowie den Untergrund auf dem die zu bestrahlenden Zellen wuchsen (2 μm Mylarfolie) durchqueren, bevor sie auf die Zellen treffen. Aufgrund extrem langer Strahlzeiten bei Dosen über 50 Gy fanden die Bestrahlungen im Kühlschrank bei 4°C statt. Hierzu wurde, wie auch bei Röntgenbestrahlungen, das Kulturmedium abgesaugt und gegen eiskaltes PBS ausgetauscht. Zur Untersuchung der Reparaturkinetiken wurde nach der Bestrahlung ebenfalls wieder das alte Medium verwendet.

Aufgrund der Kurzen Reichweite von Teilchenstrahlungen ist die Bestrahlung von Zellen durch α -Teilchen nicht in Kulturflaschen möglich. Der 1 mm dicke Kunststoffboden kann von den emittierten Teilchen der Quelle nicht durchdrungen werden. Deshalb wurden zur Untersuchung der Induktion und Reparatur von DNA-DSBs nach α -Bestrahlungen keine Kulturflaschen verwendet, sondern mit 2 μm dicker Mylarfolie bespannte 65 cm² große Kunststoffringe. Diese Folie kann von den emittierten α -Teilchen problemlos durchdrungen werden. Die Folien wurden zuvor mittels eines zellverträglichen Zweikomponentenklebers (UHU[®] Plus endfest 300) auf die Kunststoffringe geklebt und anschließend durch zweimaliges Waschen in 70%igen Ethanol, sowie einer folgenden dreimaligen Spülung mit autoklaviertem Milli-Q Wasser (Millipore[®]) sterilisiert. Die Aussaat der Zellen erfolgte 4-7 Tage vor dem Experiment.

Um die Induktion und Reparatur von DNA-DSBs nach niedrigen Dosen dicht ionisierender Strahlung messen zu können, wurden die DNA-DSBs mittels γ -H2AX - Fluoreszenzfärbung nachgewiesen. Beim radioaktiven Zerfall von ²⁴¹Americium werden die entstehenden α -Teilchen in alle Richtungen emittiert. Daher werden die Zellen bei einer Bestrahlung ohne ein richtunggebendes Utensil einen ungerichteten Teilchendurchgang erfahren. Das heißt, es können sowohl vertikale (vergl. Abb. 2.2A Spur 2) als auch nahezu horizontale (vergl. Abb. 2.2A Spur 4) Teilchenbahnen auftreten. Da dicht ionisierende Teilchen entlang ihrer Bahn mehrere DNA-DSBs induzieren, ergibt sich je nach Winkel der Teilchenbahn zum Betrachter ein unterschiedliches Bild der Induktion und Reparatur der DNA-DSBs. Ein vertikal durchlaufendes Teilchen ergibt nur einen detektierbaren Fokus, welcher aber mehrere DNA-DSBs beinhalten kann. Ein horizontal durchlaufendes Teilchen kann mehrere sichtbare Foci erzeugen. Dem

Betrachtet man es aber nicht möglich mit Bestimmtheit zu sagen, ob diese Foci von einem horizontal durchlaufenden Teilchen oder von mehreren vertikalen durchlaufenden Teilchen stammen. Eine Möglichkeit diese ungerichteten Teilchenbahnen zu kanalisieren, stellt die Verwendung eines Kollimators dar. Durch eine Kollimierung (Abb. 2.2A) kann eine gerichtete Bestrahlung der Proben erfolgen. Somit ist jeder Fokus eindeutig einer nahezu vertikalen Teilchenspur zuzuordnen und es kann die Reparatur ganzer Teilchenbahnen verfolgt werden.

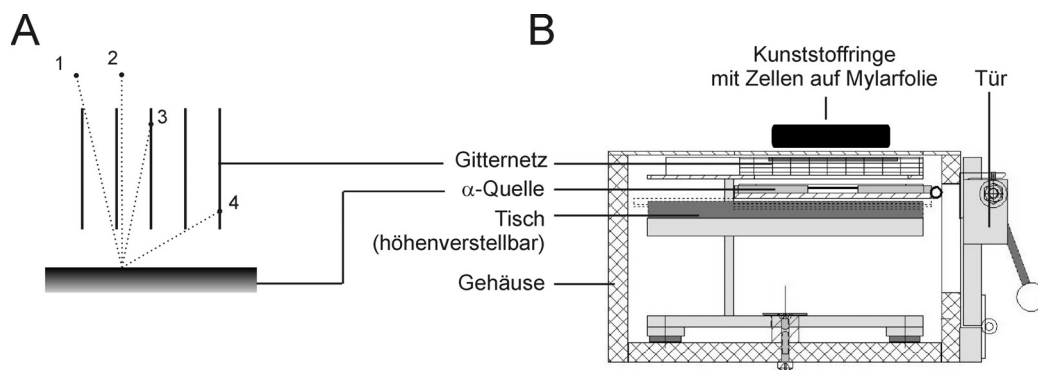


Abb. 2.2: Wirkungsweise und Aufbau eines Kollimators.

(A) Funktionsprinzip: Die α -Teilchen 1 und 2 entfernen sich nahezu rechtwinklig zur Quelloberfläche, wodurch sie die Zellkerne nur in vertikaler Richtung durchqueren können (siehe auch Abb. 1.9C). Die α -Teilchen 3 und 4 werden vom Gitternetz absorbiert, da die Emissionsrichtung dieser Teilchen zu stark vom Lot abweicht. (B) Graphische Darstellung des Aufbaus des benutzten Kollimators in Seitenansicht. Wegstrecke der α -Teilchen: 2 cm Helium-Atmosphäre, 2 μm Mylarfolie (Kollimator), 2 μm Mylarfolie (Wachstumsuntergrund der Zellen), Zellen.

Abbildung 2.2B zeigt den Aufbau des benutzten Kollimators. Die α -Quelle befand sich ca. 2 cm unterhalb der Proben. Der Energieverlust der Teilchen beim Durchqueren dieser Strecke wurde durch eine Begasung des Kollimators mit Helium möglichst gering gehalten (SRIM-Analyse; *The Stopping and Range of Ions in Matter*, www.srim.org). So betrug die, mit einem Oberflächensperrschichtdetektor gemessen, mittlere Energie der Teilchen nach mindestens 1 min vorangehender Helium-Begasung 3,7 MeV, was einem LET von 111,6 keV/ μm entspricht. Die Bestimmung der Fluenzrate ($1,67 \cdot 10^3$ Teilchen $\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) erfolgte durch Auszählung von Kernspuren bestrahlter CR39-Plättchen an der GSI in Darmstadt. Demnach ergibt sich eine Dosisrate von 18,2 mGy/min.

2.2.3 Schwerionenbestrahlung

Die Bestrahlungen mit niederenergetischen Ionen (wenige MeV/u) erfolgten am UNILAC-Beschleuniger (*universal linear accelerator*) der GSI in Darmstadt. Für die Bestrahlungen wurden die Zellen ca. 9 Tage (MRC-5) bzw. 2 Tage (MGH-U1) vor dem Experiment in Petrischalen ($\varnothing = 35$ mm; Nunc®) überimpft. Damit die notwendige Zellzahl für die PFGE erreicht werden konnte, wurden pro Bestrahlungspunkt 8 Petrischalen MRC-5 bzw. 5 Petrischalen MGH-U1 verwendet. Zum Strahlzeittermin wurden die Petrischalen in eigens entwickelte Transportbehälter überführt und diese in Styroporboxen mit Wärmeakkumulatoren transportiert. Nach 1½ h bis 2 h Transportzeit von Homburg nach Darmstadt konnten die Zellen wieder in einen CO₂-Inkubator (37°C) überführt werden. Durch eine Äquilibration (ca. 1 h) der Proben im Inkubator vor der Bestrahlung wurden einheitliche Bedingungen für jeden Bestrahlungspunkt geschaffen. Vorangehende Tests haben gezeigt, dass der Transport der Zellen im PKW keine Degradation verursacht, was sich durch degradationsfreie Kontrollen nach elektrophoretischer Auftrennung auch in den Experimenten bestätigte.

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte in „Cave 6“ mittels der biologischen Bestrahlungsanlage (BIBA) (Kraft *et al.* 1980). Die Steuerung der Proben, welche senkrecht zum Strahl orientiert waren, erfolgte durch eine an der GSI entwickelte Software außerhalb des Caves (Abb. 2.3). Die Dosimetrie der einzelnen Experimente erfolgte durch Auszählung von Kernspuren auf bestrahlten CR39 Plättchen durch kurze Ätzung mit 11 M Natronlauge an einem Licht- oder Elektronenmikroskop durch Mitarbeiter an der GSI. Eine Übersicht der verwendeten Ionen und ihrer Merkmale ist in

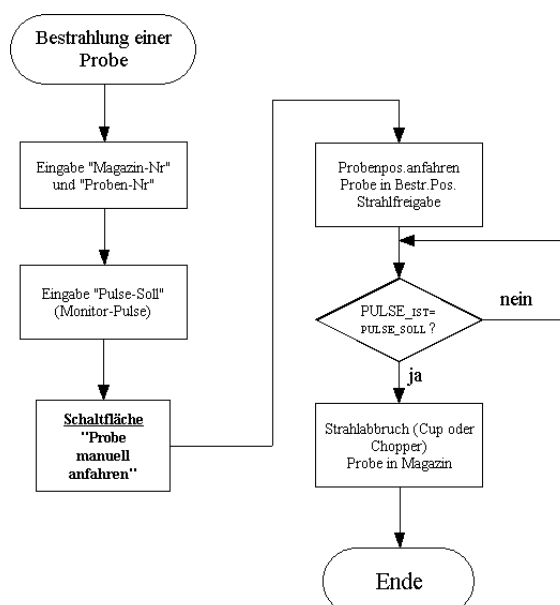


Abb. 2.3: Software-Arbeitsschritte an der biologische Bestrahlungseinheit am UNILAC. (Aus Internet-Bildmaterial der Biophysik der GSI, Darmstadt)

Tabelle 2.3 dargestellt. Der Unterschied der Teilchenenergien vom Austrittsfenster auf das Target (Zellkerne) ist auf eine 70 mm lange Distanz zwischen beiden Punkten zurückzuführen, welchen die Ionen durch Luft zurücklegen müssen, wobei sie einen Teil ihrer Energie verlieren.

Zum Zeitpunkt der Bestrahlung befanden sich die Zellen in eiskaltem PBS. Jede Petrischale wurde einzeln in die Strahlebene gebracht, der Shutter geöffnet und die Probe homogen bestrahlt (siehe Abb. 2.1). Induktionspunkte wurden sofort (bis zum Punkt der Einbettung in Lysepuffer) im Anschluss an die Bestrahlung kalt aufgearbeitet. Reparaturzeiten bis zu 4 h wurden ebenfalls an der GSI aufgearbeitet. Reparaturproben über 4 h wurden wieder nach Homburg transportiert und dort aufgearbeitet. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde bei allen Reparaturpunkten allerdings frisches statt dem ursprünglichen Medium verwendet.

Tabelle 2.3: Benutzte Strahlenarten und ihre Merkmale.

Ion	Energie ^b (Austrittsfenster) [MeV/u]	Energie ^b (Target) [MeV/u]	Energie (Target) [MeV]	LET (Target) [keV/μm]	Reichweite in Wasser ^c [μm]
α-Teilchen ^a ^4He	-	0,92	3,66	114	24
Kohlenstoff ^{12}C	11,4	9,9	119	167	400
Magnesium ^{26}Mg	11,4	8,3	216	716	209
Chrom ^{52}Cr	11,4	6,5	338	2630	106
Nickel ^{58}Ni	11,4	6,2	360	3390	96
Zink ^{70}Zn	11,4	5,6	392	3880	92
Zinn ^{124}Sn	11,4	4,75	589	8000	84
Xenon ^{132}Xe	11,4	4,4	581	8816	74
Uran ^{238}U	11,4	4,2	1000	14925	83

^a – ^{241}Am -Flächenstrahler Homburg

^b – gleiche Werte entsprechen gleicher Geschwindigkeit (vgl. Kap. 1.1.3)

^c – ermittelt durch SRIM-2003.20 (www.srim.org)

2.3 Datenanalyse

2.3.1 Kalibrierung des Molekulargewichtes der durch Pulsfeldgelelektrophorese separierten doppelsträngigen DNA-Fragmente

Zur Berechnung der Induktionsraten musste die Länge ($\hat{=}$ Molekulargewicht), der durch die PFGE separierten dsDNA-Fragmente, bestimmt werden. Die Längenstandards *H. wingei* und *Low Range PFG Marker* dienen der Umrechnung der Wanderungstrecke der ins Agarosegel eluierten dsDNA-Fragmente in ihr entsprechendes Molekulargewicht. Die Positionen der jeweiligen Banden im Gel und ihr korrespondierendes Molekulargewicht bilden die Referenzpunkte für die in Abbildung 2.4 dargestellten Kalibrierungskurven. Das Laufverhalten von dsDNA-Fragmenten unter den gegebenen Elektrophoresebedingungen wird durch ein exponentiell-linearer Fit (Gl. 2.1) mathematisch sehr gut beschrieben.

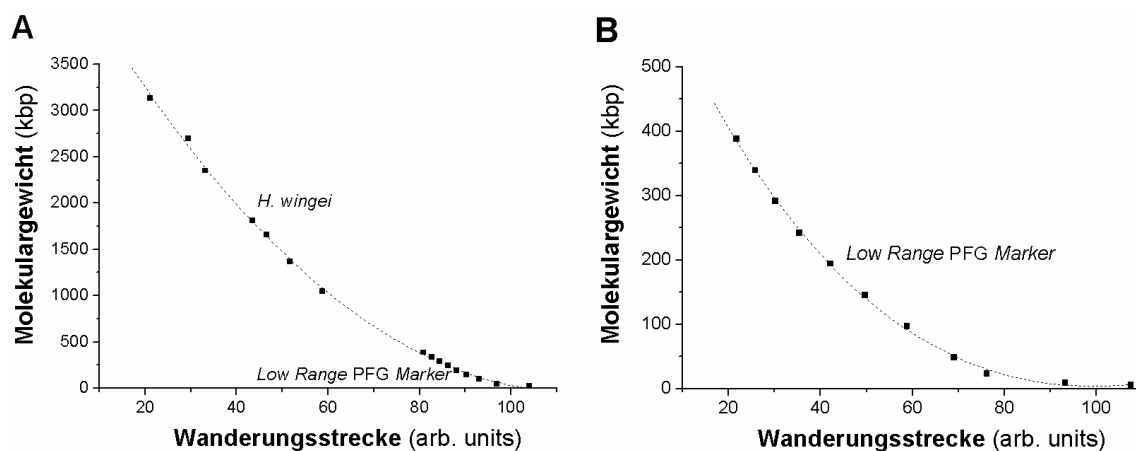


Abb. 2.4: Beziehung zwischen Molekulargewicht und Wanderungstrecke nach Southern-Hybridisierung.

Die Punkte markieren die Positionen der Größenmarker der Längenstandards, welche der Kalibrierung des Molekulargewichts durch eine exponentiell-lineare Funktion (gepunktet) dienen. (A) PFGE-Laufbedingungen für große Fragmente (200 kbp-3000 kbp). (B) PFGE-Laufbedingungen für kleine DSB-Fragmente (20 kbp-500 kbp).

$$k = p_1 \cdot e^{\frac{x}{p_2}} + p_3 \cdot x + p_4 \quad (2.1)$$

k – Fragmentlänge; x – Wanderungstrecke; p_1 - p_4 – freie Fitparameter

2.3.2 Direkte DNA-Doppelstrangbruch-Quantifizierung

Die direkte Bestimmung von DNA-DSBs erfolgte nach der gleichen Methode, welche in anderen Studien eingesetzt wurde (Löbrich *et al.* 1996; Höglund *et al.* 2000; Höglund und Stenerlöv 2001, Pinto *et al.* 2002). Entsprechend der Banden der Längenstandards wurde jede Spur (eine Spur = ein Bestrahlungspunkt) in verschiedene Segmente (s) (Tabelle 2.4) unterteilt. Nach erfolgter Southern-Hybridisierung mit genomischer DNA wurde der prozentuale DNA-Gehalt für jede Spur in jedem Segment ermittelt. Durch eine Multiplikation dieses Wertes mit der Länge des gesamten Genoms ergibt sich der DNA-Anteil im jeweiligen Größenbereich, welcher die Summe der Länge aller im Bereich vorhandenen Fragmente pro Genom widerspiegelt. Eine Division des DNA-Anteils (F_s) durch die mittlere Fragmentlänge des jeweiligen Segments (m_s) ergab die Anzahl an dsDNA-Fragmenten für jeden Größenbereich (r_s) (Gl. 2.2). Die Summe über alle r_s gibt die absolute Anzahl an generierten dsDNA-Fragmenten, die Anzahl an induzierten DNA-DSBs, pro Genom an.

$$r_s \cong \frac{F_s}{m_s} \quad (2.2)$$

r_s – Fragmentanzahl in s; F_s – DNA-Gehalt in s; m_s – mittlere Fragmentlänge von s

Tabelle 2.4: Segment (s), ihre Grenzen und ihr mittleres Molekulargewicht (m_s).

Segmentbereich (s) [kbp]	mittleres Molekulargewicht des Segmentbereiches (m_s) [kbp]
3130 – 5700 ^a	4415
2700 – 3130	2915
1810 – 2700	2255
1370 – 1810	1590
1050 – 1370	1210
800 – 1050	925
600 – 800	700
390 – 600	495
240 – 390	315
145 – 240	193
48 – 145	97
0 – 48	23

^a – entspricht der Kompressionszone

2.3.3 Quantitative Analyse - Bestimmung der Induktionsraten in verschiedenen Fragment-Größenbereichen mithilfe des RBM

Durch die exakte Bestimmung des Molekulargewichts als Funktion der Laufstrecke, konnte der Masseanteil der induzierten dsDNA-Fragmente in beliebigen Größenbereichen bestimmt werden. Unter Berücksichtigung des unspezifischen Hintergrundes der Southern-hybridisierten Nylon-Membranen wurde der DNA-Gehalt in jedem Größenbereich für jeden Induktionspunkt ermittelt. Der DNA-Gehalt ergab sich aus dem Integral der Intensitätsverteilungen über den jeweiligen Größenbereich, (z.B. mittels: AIDA; Raytest). Die Berechnung der bereichsabhängigen Induktionsraten geschah durch einen Fit auf Grundlage des RBM (Gl. 1.11) (Blöcher 1990), in das noch zwei weitere Korrekturfaktoren eingeführt und die DSB-Anzahl (r) durch das Produkt aus Induktionsrate (i), Dosis (D) und Genomlänge (n) ersetzt wurden, wodurch sich Gleichung 2.3 ergibt. Für jeden Größenintervall wurde der DNA-Gehalt gegen die Dosis aufgetragen und anschließend das theoretisch Modell nach Gleichung 2.4 mit i als freiem Parameter gefittet.

$$F_{<k} = \left(1 - e^{-i \cdot (D + DH) \cdot k} \cdot \left(1 + i \cdot (D + DH) \cdot k \cdot \left(1 - \frac{k}{n} \right) \right) \right) \cdot \text{Max} \quad (2.3)$$

$F_{<k}$ – Fragmentmasse der Fragmente kleiner k; i – Induktionsrate; D – Dosis, k – Fragmentlänge; n – Genomlänge; DH – Korrekturfaktor (gibt Dosishintergrund an); Max – Korrekturfaktor (gibt den Anteil der maximal ins Gel eluierbaren DNA-Masse wieder)

$$F_{\text{Int}} = F_{<kog} - F_{<kug} \quad (2.4)$$

F_{Int} – DNA-Gehalt des Größenintervalls; $F_{<kog}$ – Anteil der Fragmentmasse kleiner der oberen Grenze des Intervalls; $F_{<kug}$ – Anteil der Fragmentmasse kleiner der unteren Grenze des Intervalls

2.3.4 Analyse der Reparatur dsDNA-Fragmente nach Bestrahlung mit dicht ionisierenden Teilchen

Wie bei der Bestimmung der Induktionsraten in verschiedenen Fragment-Größenbereichen liegt auch der Messung der Reparatur von DNA-DSBs die Methode des FAR-Assays zugrunde. Dieser Assay setzt die ins Gel gelaufene DNA-Menge mit der gesamten DNA jeder einzelnen Spur ins Verhältnis (FAR-Wert). So konnte nach erfolgter PFGE und anschließender Southern-Hybridisierung der DNA-Gehalt in allen untersuchten Fragment-Größenbereichen ermittelt werden. Anhand der Induktionspunkte

wurde für jede Strahlenart und jede Fragmentausschlussgröße die entsprechende Dosis-Effekt-Kurve erstellt (siehe Abb. 2.5). Die Ermittlung der DSB-Reparaturkinetiken in diesen Bereichen ergab sich aus der Bestimmung des Dosisäquivalents zu jedem Reparaturzeitpunkt. Das Dosisäquivalent entspricht dabei dem Wert der Dosis, der sich anhand des FAR-Wertes der Reparaturprobe aus der Dosis-Effekt-Kurve ergibt. Diese Äquivalente wurden ins Verhältnis zur Initialdosis der Reparaturpunkte gesetzt, wodurch sich für jeden Zeitpunkt der prozentuale Anteil der verbleibenden DNA-Masse ergab.

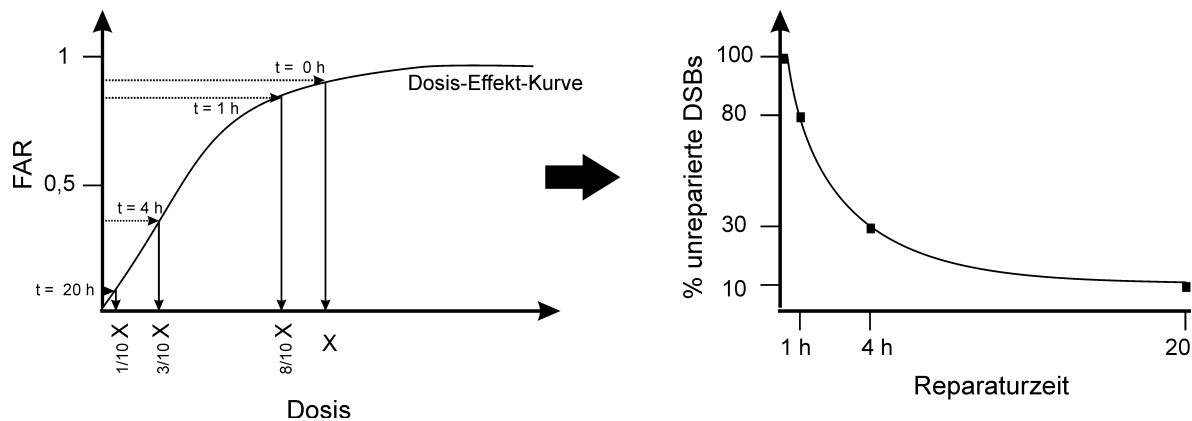


Abb. 2.5: Schematische Darstellung der Bestimmung von Reparaturkinetiken (X=Initialdosis).

3.3.5 Poisson-Verteilung und Fläche des Zellkerns

Dünn ionisierender Strahlung induziert innerhalb eines Zellkerns stochastisch verteilt DNA-DSBs. Bei hinreichend kleiner Dosis werden nur in einem Bruchteil einer Zellpopulation DNA-DSBs induziert. Die Verteilung dieser Brüche über die gesamte Population ist ebenfalls rein stochastisch. Wird eine Zellpopulation homogen und senkrecht mit dicht ionisierenden Teilchen durchstrahlt, so kann davon ausgegangen werden, dass die Verteilung dieser Teilchenbahnen über die bestrahlte Fläche eine ähnliche stochastische Verteilung zeigt (siehe Abb. 1.9C). Wird angenommen, dass diese Verteilung der Teilchenbahnen statistisch gesehen streng unabhängig voneinander erfolgt, so gehorcht die Wahrscheinlichkeit P_r für das Eintreffen von r Teilchenbahnen pro Zellkern der so genannten Poisson-Verteilung (Gl. 2.5). Die Wahrscheinlichkeit, dass ein zuvor ungeschädigter Zellkern von mindestens einem Teilchen ($P_{>0}$) durchdrungen wird, kann daher nach Gleichung 2.5 berechnet werden.

$$P_r = \frac{r_m^r \cdot e^{-r_m}}{r!} \quad (2.4)$$

P_r – Wahrscheinlichkeit für r Treffer; r_m – mittlere Trefferzahl pro Zellkern; r – Anzahl an Treffer (DNA-DSBs bzw. Teilchenbahnen)

$$P_{>0} = (1 - e^{-r_m}) + r_c \cdot e^{-r_m} \quad (2.5)$$

$P_{>0}$ – Wahrscheinlichkeit für mindestens einen Treffer; r_m – mittlere Trefferzahl pro Zellkern; r_c – Anteil der bereits „zuvor getroffenen“ Zellkerne (Kontrolle)

Für eine homogene Bestrahlung einer Zellpopulation, also eine gleichmäßige Schädigung aller Zellen, ist eine ausreichend hohe mittlere Trefferzahl pro Zellkern notwendig. Diese wird aus der Fluenz der verwendeten Strahlenart und der mittleren Fläche des Zellkerns der spezifischen Zelllinien berechnet. In Abbildung 2.6 ist eine typische Zellkernflächen-Verteilung von MRC-5 Zellen in der G_0/G_1 -Phase des Zellzyklus dargestellt. Gemessen wurde die Fläche eines Zellkerns nach erfolgter DAPI-Färbung und Aufnahme der Zellkerne mit einer Digitalkamera mit der an dieser gekoppelten Software (ISIS). Die ermittelte mittlere Fläche pro Zellkern beträgt $155 \pm 4 \mu\text{m}^2$. Demnach ergibt sich beispielhaft für eine Fluenz von $6,5 \times 10^5$ Teilchen/ cm^2 eine mittlere Trefferzahl von 1 Teilchen pro Zellkern und für eine Fluenz von 2×10^8 Teilchen/ cm^2 eine mittlere Trefferzahl von 310 Treffern je Zellkern.

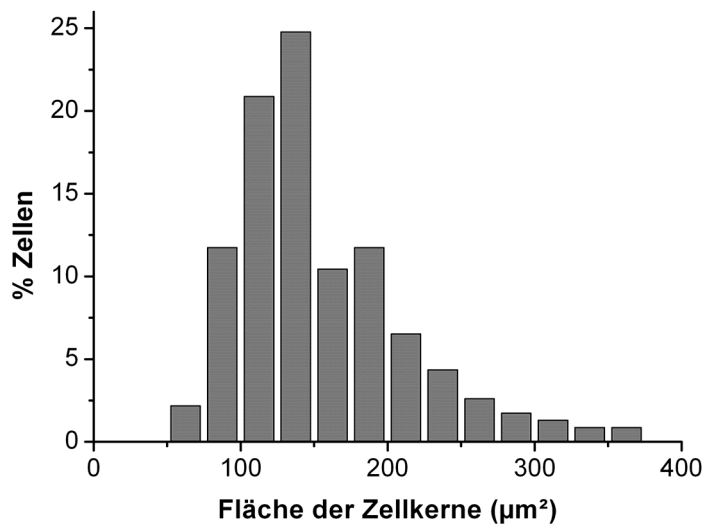


Abb. 2.6: Zellkernflächen-Verteilung konfluenter humaner Fibroblasten. Die Zellkernflächen-Verteilung wurde durch Messung 230 DAPI-gefärbter MRC-5 Zellkerne ermittelt.

3. Ergebnisse

Die Ziele dieser Arbeit sind es, die tertiäre Chromatinstrukturen mittels ionisierender Strahlung nachzuweisen und einen Beitrag zum Verständnis der DSB-Reparatur in Abhängigkeit des LET der verwendeten Strahlenart zu leisten. Hierfür müssen die durch die unterschiedlichen Strahlenarten induzierten DNA-DSBs bzw. die generierten dsDNA-Fragmente gemessen und sowohl qualitativ als auch quantitativ analysiert werden.

Um die Induktion und Reparatur von DNA-DSBs messen zu können, wurden zwei verschiedene Verfahren eingesetzt. Ein Verfahren stellt die PFGE mit anschließender Southern-Hybridisierung dar. Mittels dieser Technik konnten durch eine direkte DSB-Quantifizierung die Induktionsraten der verschiedenen Strahlenarten gemessen werden. Über die erhaltenen dsDNA-Fragmentverteilungen war des Weiteren eine Analyse der Induktion und Reparatur von DNA-DSBs in unterschiedlichen Fragment-Größenbereichen (bis zu 3 Mbp) möglich. Auch konnte durch die Verwendung spezifischer DNA-Sonden die Induktion von DNA-DSBs in verschiedenen Genomregionen (Kühne *et al.* 2000; Kühne *et al.* 2004) und, durch Anreicherung der zu bestrahlenden Zellen in der Mitose, in Abhängigkeit vom Kondensationsgrad der DNA gemessen werden. Die Nachteile dieses Verfahrens bestehen in der zur Detektion der dsDNA-Fragmente notwendigen hohen Dosis (5 Gy) und in der Bereitstellung einer genügenden DNA-Menge (Zellen).

Mittels dem in dieser Arbeit angewendeten zweiten Verfahren, dem Nachweis von einzelnen DNA-DSBs bzw. von einzelnen Teilchenbahnen über eine einfache Zählung von Akkumulationspunkten Fluoreszenz-markierter Reparaturproteine, sind Messungen zur Induktion und Reparatur im Niedrigdosis-Bereich möglich gewesen. Da in diesem Verfahren die Phosphorylierung von H2AX beobachtet wird, welche sich in Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*) über einen DNA-Bereich von ca. 100 kbp (Shroff *et al.* 2004; Lowndes und Toh 2005) und in Säugerzellen sogar von 0,9 bis zu 1,8 Mbp (Rogakou *et al.* 1998) um den DNA-DSB erstrecken kann, können weitere DNA-DSBs innerhalb dieser Distanz nicht detektiert werden.

3.1 Induktion von doppelsträngigen DNA-Fragmenten in stationären Zellen

Die Untersuchung der Induktion dsDNA-Fragmente in stationären Zellen erfolgt durch drei unabhängige Analysen. In der ersten Analyse werden die Induktionsraten der verschiedenen Strahlenarten durch eine direkte DSB-Quantifizierung erfasst. Diese Induktionsraten beschreiben in erster Linie den physikalischen Charakter der Strahlung. Die zweite Analyse umfasst eine quantitative Beurteilung der Induktion dsDNA-Fragmente in Abhängigkeit von den betrachteten Fragmentintervallen. Eine dritte Analyse untersucht die Form der DNA-Intensitätsverteilungen, wobei das Wanderungsverhalten der sichtbaren Maxima in Abhängigkeit von der Fluenz bzw. von der Dosis qualitativ beschrieben wird. Im Gegensatz zur ersten Analyse wird durch die zweite und die dritte Analyse nicht nur der physikalischen Charakter der Strahlung offensichtlich, sondern es ist auch ein Nachweis des Einflusses der höher geordneten Chromatinstruktur auf die Induktion von dsDNA-Fragmenten möglich.

3.1.1 Messung von DNA-Doppelstrangbrüchen mittels Pulsfeldgelelektrophorese

Zur Detektion von dsDNA-Fragmenten wurde die Methode der PFGE verwendet. Aufgrund des zu untersuchenden Größenbereiches zwischen 40 kbp und 3 Mbp kamen mehrere Elektrophoreseprotokolle zum Einsatz. Dies gewährleistete eine optimale Trennung der durch ionisierende Strahlung erzeugten Fragmente. In Abbildung 3.1 sind beispielhaft Ethidiumbromid-gefärbte Agarosegele für zwei Separationsbedingungen und für vier verschiedene Strahlenarten dargestellt. Experimente mit Röntgenstrahlung und α -Teilchen wurden hierbei am eigenen Institut durchgeführt, wohingegen die Bestrahlungen der Zellen mit schwereren Ionen am UNILAC-Beschleuniger der GSI in Darmstadt stattfanden. Die Intensität des Ethidiumbromidsignals der dargestellten Spuren ist proportional zum jeweiligen DNA-Gehalt. Die Größen der entstandenen Fragmente wurden mittels DNA-Marker bestimmt. Für eine Identifizierung einer höher geordneten Chromatinstruktur mithilfe der durch ionisierende Strahlungen erzeugten dsDNA-Fragmente ist ein sehr gutes Signal-Rausch-Verhältnis notwendig. Dieses Verhältnis ist nach einer Ethidiumbromidfärbung relativ schlecht. Eine mittels Southern-Hybridisierung durchgeführte DNA-Markierung mit der genomischen Sonde besitzt

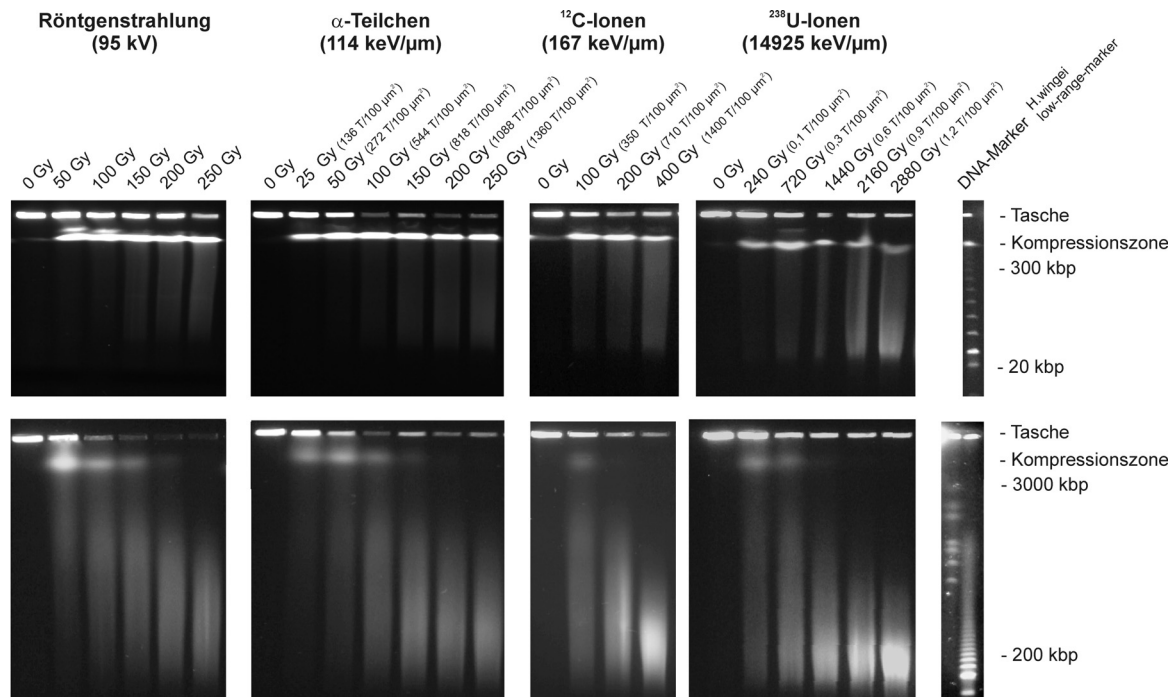


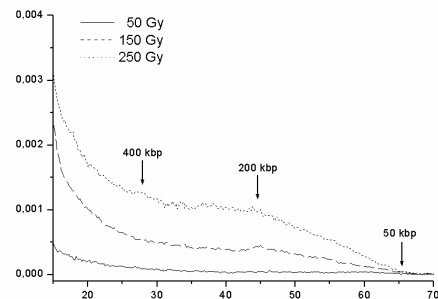
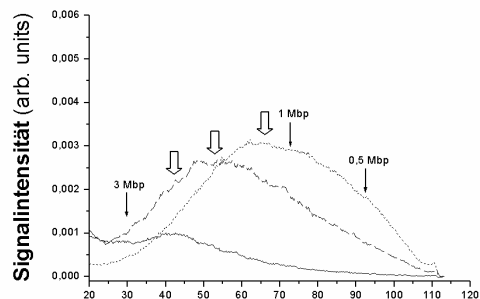
Abb. 3.1: Auftrennung von dsDNA-Fragmenten für zwei Separationsbedingungen in Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegelen.

Bestrahlt wurden MRC-5 Zellen mit vier verschiedenen Strahlenarten. Die PFGE der kleinen Fragmente (obere Reihe) lief unter folgenden Separationsbedingungen: eine Temperatur von 16°C, eine elektrischen Feldstärke von 6 V/cm und eine über 13 h gefahrenen Rampe mit Pulszeiten von 1 s bis 30 s (Röntgenstrahlung und α -Teilchen: 14°C, 4,5 V/cm, 18 h, 20 s bis 50 s). Die Auftrennungsbedingungen für größere dsDNA-Fragmente im 0,8%igen Agarosegel (untere Reihe) sind für alle Strahlenarten identisch gewesen (16°C, 3 V/cm, 60 h, 40 s bis 800 s).

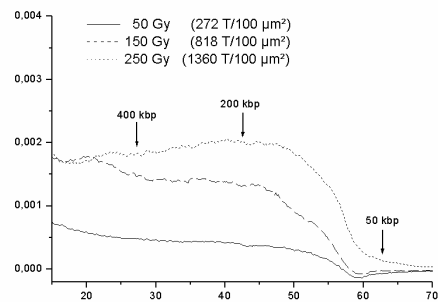
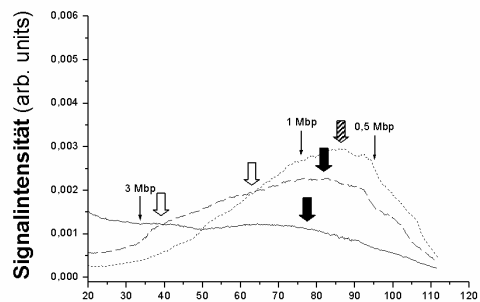
hingegen ein deutlich besseres Signal-Rausch-Verhältnis. Neben dem genaueren Nachweis der induzierten Fragmente besteht ein weiterer Vorteil der Methode der Southern-Hybridisierung in der Nutzung mehrere spezifischer DNA-Sonden, die einen direkten Vergleich der DSB-Induktion in verschiedenen Genomregionen ermöglichen. Ermöglicht wird dies durch ein Strippen (Entfernung der alten Sonde) der DNA-tragenden Nylon-Membran. So ist eine mehrmalige Hybridisierung ein und derselben Membran mit verschiedenen Sonden möglich, so dass ein einmal geblottetes Agarosegel zur Detektion der dsDNA-Fragmentverteilungen in unterschiedlichen Genomregionen genutzt werden kann.

Zur Durchführung der Southern-Hybridisierungen wurden die dsDNA-Fragmente, welche im Agarosegel separiert vorlagen, mittels eines VakuumbloTTes auf eine Nylonmembran übertragen. Anschließend erfolgte mit ^{32}P -markierten Sonden die DNA-Markierung. Durch Auslesen der Membranen mit einem Phosphorimager konnten die Fragmentverteilungen digital aufgearbeitet werden. Abbildung 3.2 zeigt beispielhaft die erhaltenen dsDNA-Fragmentverteilungen acht unterschiedlicher Strahlenarten für jeweils

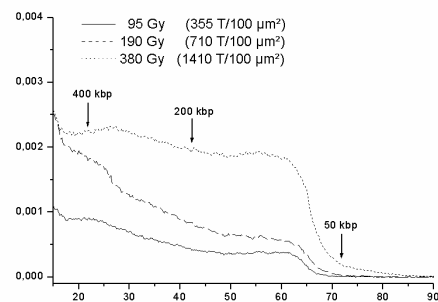
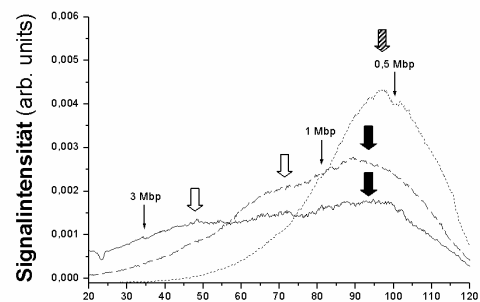
Röntgen-
strahlung
(95 kV)



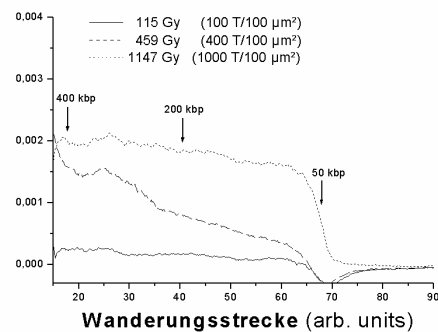
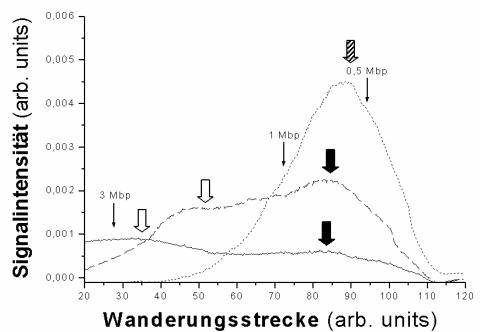
α -Teilchen
(0,92 MeV/u
114 keV/ μm^2)



^{12}C -Ionen
(9,9 MeV/u
167 keV/ μm^2)



^{26}Mg -Ionen
(8,3 MeV/u
716 keV/ μm^2)



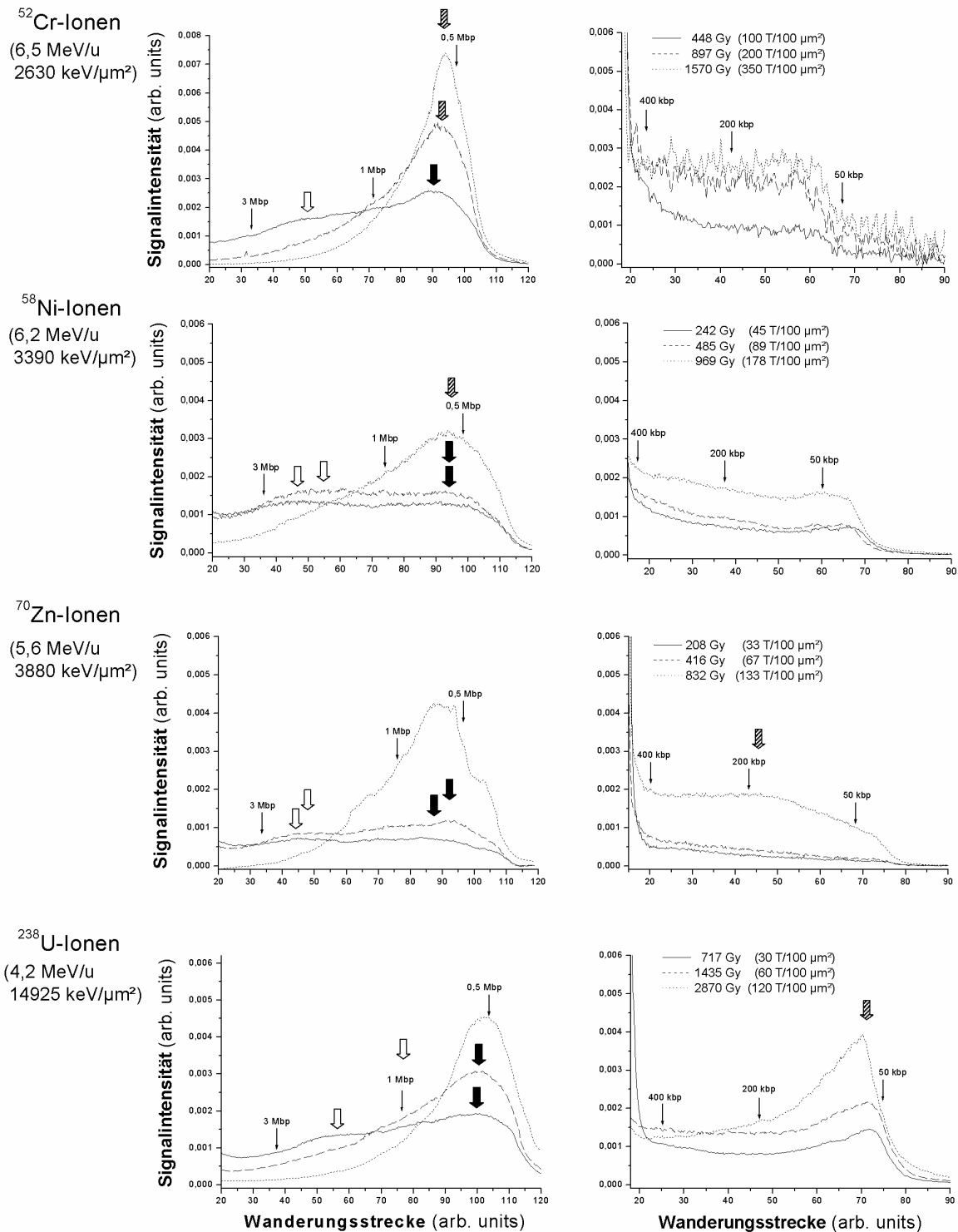


Abb. 3.2: Verteilungen des DNA-Gehaltes von dsDNA-Fragmenten in Abhängigkeit von der Wanderungsstrecke nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Strahlenarten und verschiedenen Dosen (Fluenzen).

Die linke Seite zeigt die Verteilungen für dsDNA-Fragmente kleiner 3 Mbp. Die rechte Seite stellt die Verteilungen für Fragmente kleiner 400 kbp dar. Die Verteilungen jeder einzelnen Spur ist auf gleichen DNA-Gehalt normiert worden (gesamte Spur inklusive Tasche und Kompressionszone).

Bei Experimenten mit Röntgenstrahlung und α -Teilchen wurde ein anderes PFGE-Protokoll zur Separierung kleiner Fragmente verwendet, weswegen in diesen Fällen andere Wanderungsstrecken für gleiche Fragmentgrößen gelten.

Die dicken Pfeile markieren das Wanderungsverhalten der sichtbaren Maxima der DNA-Masseverteilungen. Diese werden zur qualitativen Analyse der dsDNA-Fragmentverteilungen benötigt.

zwei Separationsbedingungen nach drei verschiedenen Strahlendosen. Als Sonde diente hierbei genomische DNA, welche das gesamte Genom markiert und somit eine äquivalente Markierung zur Ethidiumbromid-Färbung der DNA darstellt, dieser gegenüber jedoch ein deutlich besseres Signal-Rausch-Verhältnis besitzt. Die Signalintensität ($\hat{=}$ DNA-Gehalt) ist gegen die Wanderungstrecke der dsDNA-Fragmente ($\hat{=}$ Molekulargewicht) aufgetragen. Dargestellt sind die auf gleichen DNA-Gehalt (gesamte Spur inklusive der Kompressionszone und Tasche) normierten Profile für dsDNA-Fragmente kleiner 3 Mbp (links) und für dsDNA-Fragmente kleiner 400 kbp (rechts). Als ein Beispiel einer dünn ionisierenden Strahlenart ist Röntgenstrahlung (95 kV; 25 mA; 5,5 Gy/min) dargestellt. Uran-Ionen ($E_{\text{Target}} = 4,2 \text{ MeV/u}$; $\text{LET} = 14925 \text{ keV}/\mu\text{m}$), Zink-Ionen (5,6 MeV/u; $3880 \text{ keV}/\mu\text{m}$), Nickel-Ionen (6,2 MeV/u; $3390 \text{ keV}/\mu\text{m}$), Chrom-Ionen (6,5 MeV/u; $2630 \text{ keV}/\mu\text{m}$), Magnesium-Ionen (8,3 MeV/u; $716 \text{ keV}/\mu\text{m}$) und Kohlenstoff-Ionen (9,9 MeV/u, $167 \text{ keV}/\mu\text{m}$), sowie α -Teilchen (3,6 MeV, $114 \text{ keV}/\mu\text{m}$) sind hingegen dicht ionisierende Teilchen.

Ein Vergleich der Intensitätsverteilungen der acht verschiedenen Strahlenarten zeigt vor allem eine Korrelationen zwischen LET bzw. Dosis und den induzierten dsDNA-Fragmenten. Diese Korrelation bezieht sich vor allem auf kleine Fragmente ($< 0,4 \text{ Mbp}$). So führt eine niedrige Fluenz von Teilchen mit hohem LET zur gleichen prozentualen Anzahl an kleinen Fragmenten wie eine hohe Fluenz von Teilchen mit niedrigerem LET (siehe auch Rydberg *et al.* 2002). Beispielweise wird bei einer Fluenz von $133 \text{ T}/100 \mu\text{m}^2$ ^{70}Zn -Ionen ca. 0,002% der DNA eine Länge von 200 kbp aufweisen. Bei Bestrahlung der Zellen mit ^{26}Mg -Ionen ist dies erst bei einer Fluenz von ca. $1000 \text{ T}/100 \mu\text{m}^2$ zu erwarten.

Eine zweite, weniger offensichtliche Korrelation betrifft größere Fragmente ($> 1 \text{ Mbp}$). In diesem Bereich nimmt bei gleicher Dosis der prozentuale Anteil an dsDNA-Fragmenten mit Zunahme des LET ab. Beispielweise beträgt nach einer 459 Gy Bestrahlung mit ^{26}Mg -Ionen der prozentuale DNA-Anteil an Fragmenten mit einer Länge 1 Mbp ca. 0,002. Nach Bestrahlung mit ^{70}Zn -Ionen (416 Gy) fällt der Anteil von 1 Mbp langen dsDNA-Fragmenten auf ca. 0,001%. Mittels der quantitativen Analyse (Kap. 3.1.3) wird diese Korrelation zwischen dem LET der Strahlung und dem prozentualen DNA-Anteil sehr viel deutlicher.

3.1.2 Direkte DNA-Doppelstrangbruch-Quantifizierung

Zur Ermittlung der DSB-Induktionsraten durch die direkte DSB-Quantifizierung wurde die durch PFGE aufgetrennte und auf eine Nylon-Membran übertragene DNA in verschiedene Segmente aufgeteilt. Die Grenzen dieser Segmente sind durch die DNA-Größenmarker vorgegeben (siehe Abb. 3.1). Zusätzlich kommen noch zwei weitere Zonen hinzu, da möglichst alle messbaren DNA-DSBs erfasst werden sollen. Eine Zone umfasst dsDNA-Fragmente, welche ein größeres Molekulargewicht als 3130 kbp besitzen (inklusive Kompressionszone [Fragmente bis ca. 5700 kbp]). Die zweite Zone enthält alle Fragmente kleiner 48 kbp. Die Grenzen der Segmente und deren mittleres Molekulargewicht sind in Tabelle 2.4 aufgelistet.

Nach der Bestimmung des prozentualen DNA-Gehaltes in jedem Segment wurde dieser Wert mit der gesamten genomischen Länge (6,2 Gbp) multipliziert. Dadurch ergab sich die Summe der Länge aller Fragmente in der jeweiligen Zone pro Genom. Anschließend wurde die Anzahl an dsDNA-Fragmenten im jeweiligen Fragment-Größenbereich berechnet. Die Anzahl ergab sich durch Division des DNA-Anteils (Summe der Länge aller Fragmente in der jeweiligen Zone) durch das mittlere Molekulargewicht der jeweiligen Zone (Gl. 2.2). Die vollständige Anzahl an induzierten DNA-DSBs ergibt sich aus der Summierung der Anzahl der Fragmente aus allen Größenbereichen, sowie nachfolgender Subtraktion der Anzahl der gemessenen Fragmente der unbestrahlten Probe.

Diese Arbeitsschritte wurden für jede Fluenz bzw. Dosis und jede Strahlenart durchgeführt. Anschließend konnte die Anzahl an DNA-DSBs als Funktion der Fluenz (Abb. 3.3) bzw. als Funktion der Dosis aufgetragen werden. Durch eine lineare Regression an die entsprechenden Daten sind die direkten Induktionsraten ermittelbar (Tabelle 3.1). Es ist deutlich ersichtlich, dass die Anzahl der durch ein Teilchen induzierten DNA-DSBs mit zunehmender Ionisationsdichte der Teilchen (LET) ansteigt. So induziert ein ^{12}C -Ion beim Durchtritt durch den Zellkern ca. 10 DNA-DSBs, wohingegen ein ^{70}Zn -Ion über 100 DNA-DSBs induzieren kann.

Diese Arbeitsschritte wurden für jede Fluenz bzw. Dosis und jede Strahlenart durchgeführt. Anschließend konnte die Anzahl an DNA-DSBs als Funktion der Fluenz (Abb. 3.3) bzw. als Funktion der Dosis aufgetragen werden. Durch eine lineare Regression an die entsprechenden Daten sind die direkten Induktionsraten ermittelbar (Tabelle 3.1). Es ist deutlich ersichtlich, dass die Anzahl der durch ein Teilchen induzierten DNA-DSBs mit zunehmender Ionisationsdichte der Teilchen (LET) ansteigt.

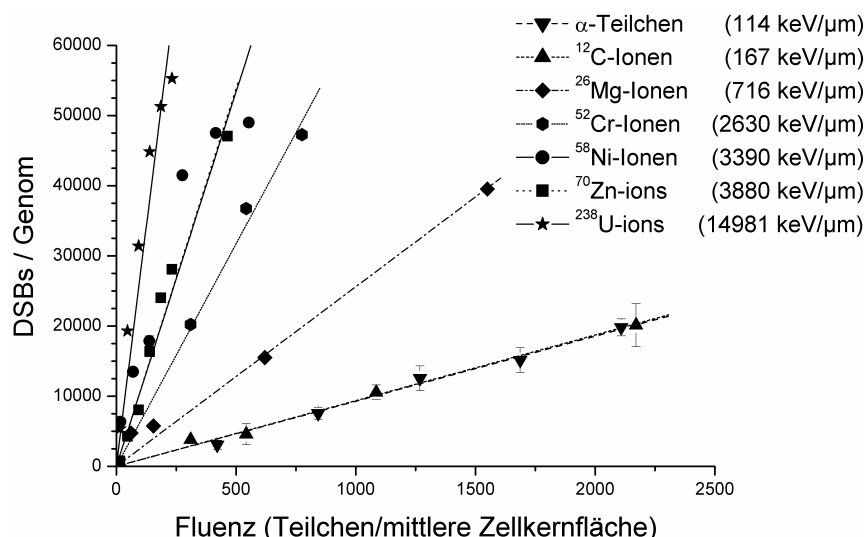


Abb. 3.3: Induktion von DNA-DSBs in stationären MRC-5 Zellen als Funktion der Fluenz. Den Datenpunkten liegen eine diploide genomische Länge von 6,2 Gbp und eine mittlere Zellkernfläche von $155 \mu\text{m}^2$ zugrunde. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler aus zwei bis drei unabhängigen Experimenten dar. Die Geraden beruhen auf einer linearen Regression an die Datenpunkte.

Zusätzlich sind in Tabelle 3.1 die RBW bezüglich der Induktion von DNA-DSBs unter Verwendung von 95 kV Röntgenstrahlen als Referenzstrahlung bestimmt wurden. Die RBW stellt das Verhältnis der Dosen dar, die bei einer Vergleichsstrahlung und der zu testenden Strahlung zum gleichen Effekt führen. Die RBW zeigt, dass bei einem LET von ca. $100 \text{ keV}/\mu\text{m}$ ein Maximum der Induktion an DNA-DSBs pro deponierter Energieeinheit (Gy) erreicht wird. Bei diesem LET liegt die mittlere Entfernung zwischen zwei Ionisations-

Tabelle 3.1: Durch eine direkte DSB-Quantifizierung ermittelte Induktionsraten nach Bestrahlung von stationären MRC-5 Zellen mit unterschiedlichen Strahlenarten.

Strahlenart	LET (keV/ μm)	DSB – Anzahl \pm SE ^{a,c} (DSBs/Gy/Zelle)	RBW ^d	DSB – Anzahl \pm SE ^{a,b,c} (DSBs/Teilchen/Zellkern)
Röntgenstrahlung		$47,0 \pm 2,8$	1,00	-
α -Teilchen	114	$78,3 \pm 1,6$	1,66	$9,3 \pm 0,2$
^{12}C -Ionen	167	$54,2 \pm 1,3$	1,15	$9,4 \pm 0,2$
^{26}Mg -Ionen	716	$34,6 \pm 1,3$	0,74	$25,6 \pm 1,0$
^{52}Cr -Ionen	2630	$21,9 \pm 0,6$	0,46	$63,4 \pm 1,8$
^{58}Ni -Ionen	3390	$30,5 \pm 2,7$	0,65	$106,7 \pm 9,6$
^{70}Zn -Ionen	3880	$26,8 \pm 1,0$	0,57	$107,7 \pm 4,2$
^{238}U -Ionen	14925	$17,7 \pm 1,1$	0,38	$273,1 \pm 16,5$

^a – 6,2 Gbp pro diploider Zelle in der G_0/G_1 -Phase.

^b – Bei Annahme einer mittleren Zellkernfläche von $155 \mu\text{m}^2$.

^c – Standardfehler der linearen Regression.

^d – Die RBW wurde in dieser Untersuchung mit 95 kV Röntgenstrahlen als Referenzstrahlung angegeben.

ereignissen der Teilchen bei etwa 2 nm. Dies entspricht dem Durchmesser der DNA-Doppelhelix. Durch die Übereinstimmung der mittleren Ionisationsdichte der Teilchen mit dem Abstand der Zuckerphosphatgerüste der DNA kann die maximale Ausbeute an induzierten DNA-DSBs pro Gray bei einem LET von 100 keV/μm erklärt werden. Eine Erhöhung des LET über 100 keV/μm führt dazu, dass im Raum eines DNA-DSBs, statt der zwei minimal notwendigen, mehrere Ionisationen auftreten. Das heißt, die durch die Teilchen deponierte Energie nimmt pro einzelnen DNA-DSB zu. Dadurch sinkt wiederum mit zunehmenden LET die RBW. Die gleiche Abhängigkeit der RBW vom LET der untersuchten Strahlenarten, mit einem Maximum bei ca. 100 keV/μm, für verschiedene biologische Endpunkte ist bereits in mehreren Arbeiten veröffentlicht und zusammengefasst wurden (Günther und Schulz 1983; Hall 2000).

3.1.3 DNA-Fragmentverteilungen in G₀/G₁-Zellen – Quantitative Analyse

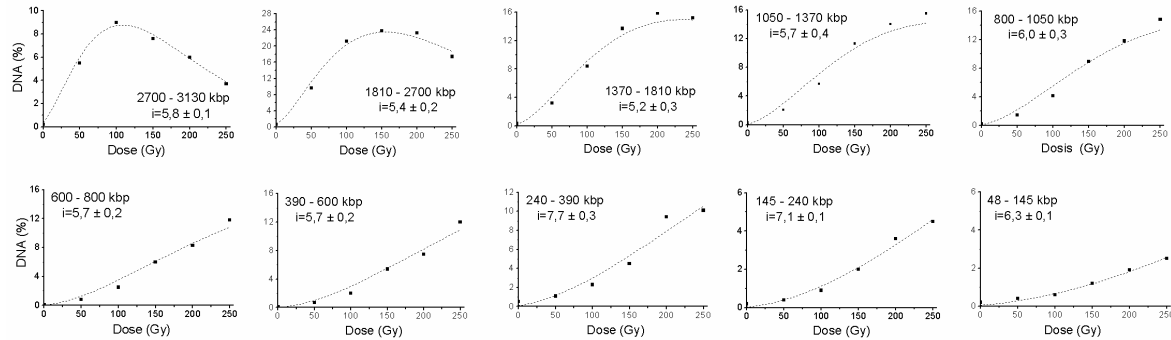
Die quantitative Analyse der erhaltenen dsDNA-Fragmentverteilungen umfasst die Berechnung und den Vergleich der Induktionsraten in spezifischen Fragment-Größenbereichen. Um diese Analyse der erhaltenen Fragmentverteilungen durchführen zu können, wurde jedes einzelne DNA-Profil, wie im vorangehenden Kapitel, in verschiedene Fragment-Größenintervalle unterteilt und der prozentuale DNA-Gehalt unter Berücksichtigung des unspezifischen Membran-Hintergrund-Signals darin bestimmt. Anschließend konnten so für jeden Größenbereich die Induktionspunkte gegen die applizierte Dosis aufgetragen werden. Diese Datenpunkte sind in Abbildung 3.4 für ausgewählte Experimente jeder Strahlenart gezeigt.

Der Verlauf der Kurven stellt einen physikalischen Aspekt dar. Mit Zunahme der Dosis bzw. der Fluenz nimmt die Anzahl der erzeugten DNA-DSBs zu, somit entstehen mehr dsDNA-Fragmente. Bei einer weiteren Dosiserhöhung werden die bisher „großen“ Fragmente durch weitere DNA-DSBs zu kleineren Fragmenten, womit der DNA-Gehalt in den betrachteten Größenbereichen ab einer bestimmten Dosis wieder abnimmt.

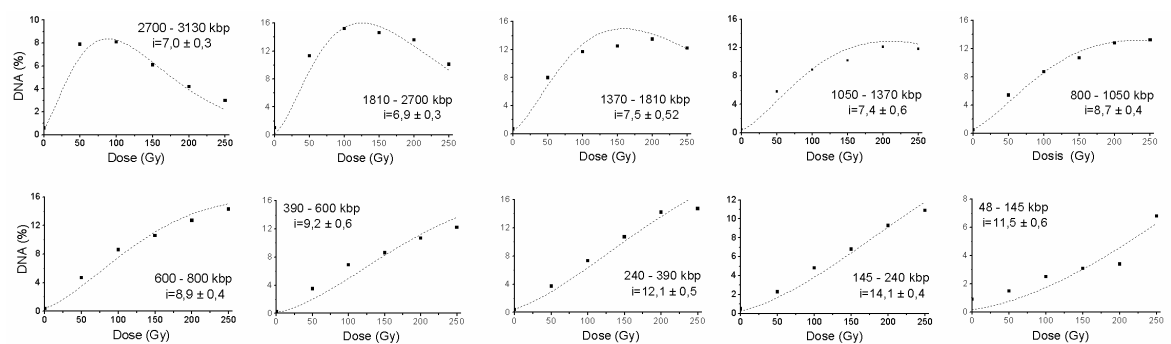
Zur Bestimmung der DSB-Induktionsraten in den verschiedenen Fragment-Größenbereichen wurden die Induktions-Datenpunkte an das RBM, das einfachste Modell für die Induktion von DNA-DSBs, gefittet (Abb. 3.4 gestrichelte Linien). Veröffentlichte experimentelle Daten (Kraxenberger *et al.* 1998; Höglund *et al.* 2000) zeigen eine sehr gute Übereinstimmung des Modells mit der Induktion von DNA-DSBs durch dünn ionisierende Strahlung. Daher sollte auch in dieser Arbeit keine signifikante Differenz zwischen dem Modell und den gemessenen Daten nach Röntgenbestrahlung

beobachtbar sein. Eine Übereinstimmung ist dadurch erkennbar, dass ein Fit des RBM an die gemessenen Daten unabhängig vom untersuchten Fragment-Größenbereich ist, dass heißt das die Induktionsraten konstant sein sollten. Für jeweils ein ausgewähltes Experiment sind die berechneten Induktionsraten der Bereiche in Abbildung 3.4 in jeden Graph eingetragen. Der angegebene Fehler gibt den Standardfehler des Fittens des

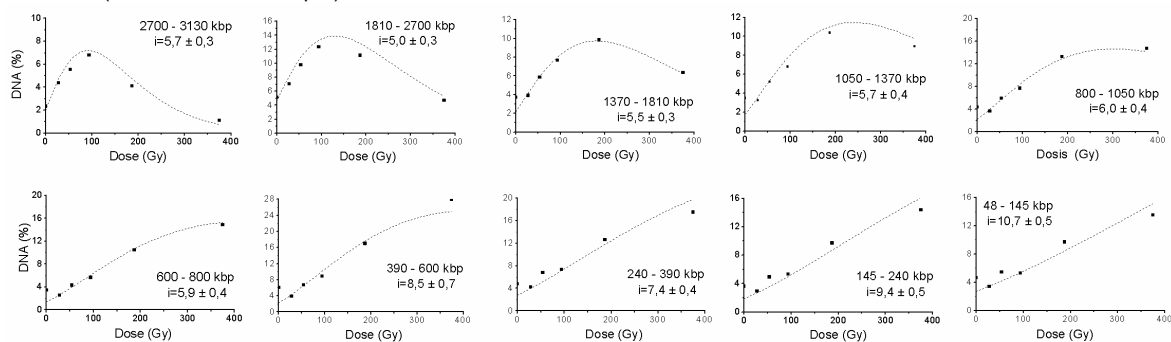
Röntgenstrahlung (95 keV)



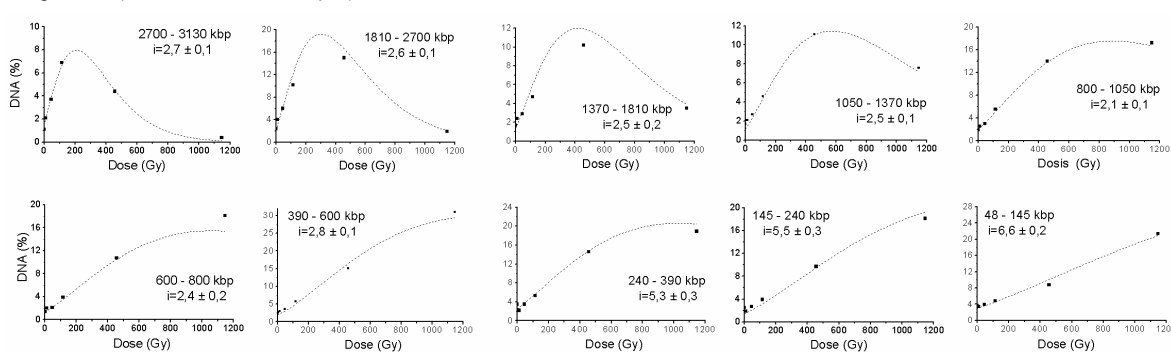
α -Teilchen (0,92 MeV/u; 114 keV/ μ m)



^{12}C -Ionen (9,9 MeV/u; 167 keV/ μ m)



^{26}Mg -Ionen (8,3 MeV/u; 716 keV/ μ m)



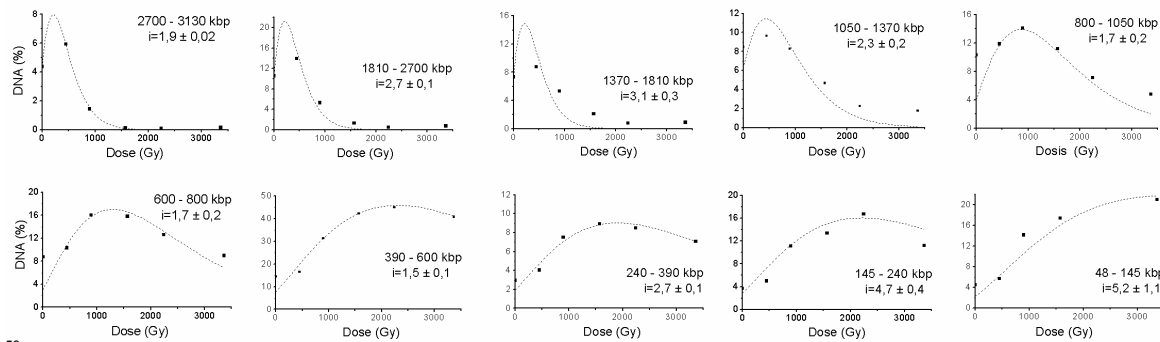
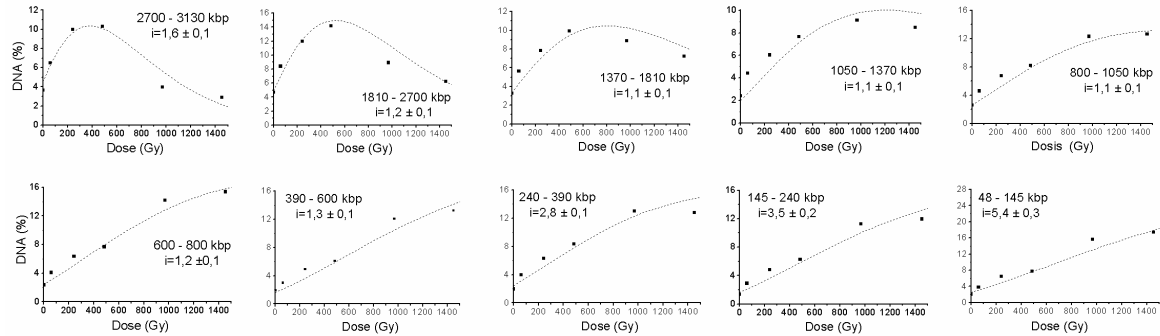
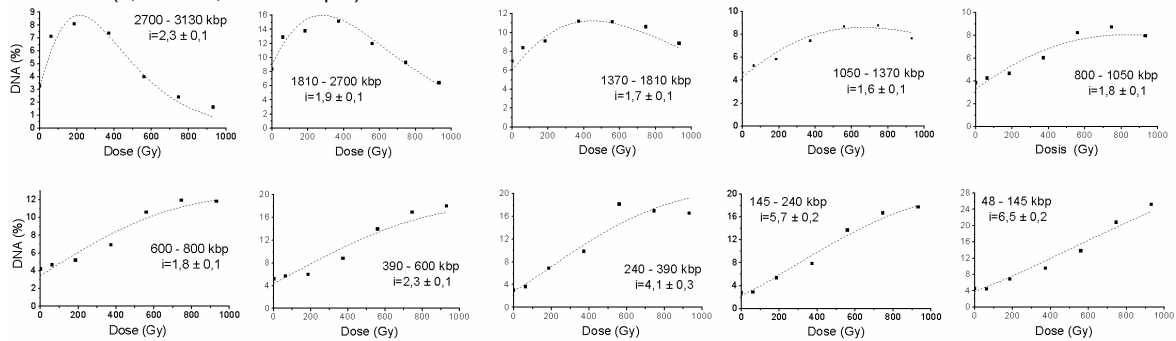
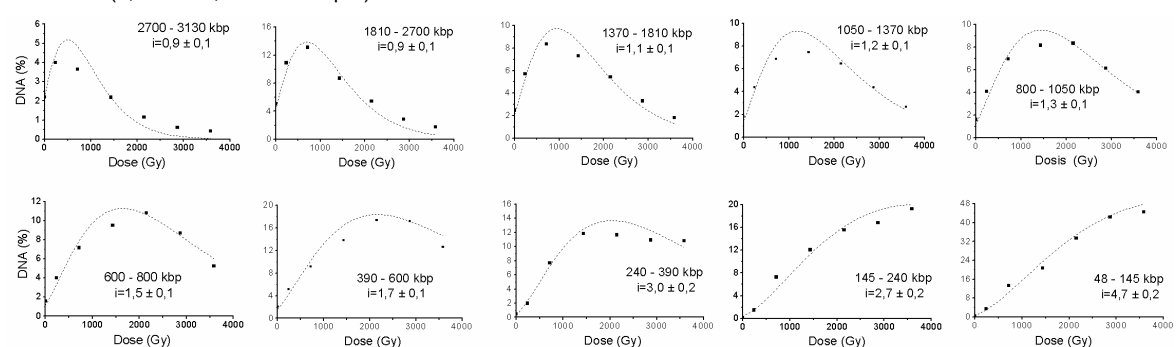
⁵²Cr-Ionen (6,5 MeV/u; 2630 keV/μm)⁵⁸Ni-Ionen (6,2 MeV/u; 3390 keV/μm)⁷⁰Zn-Ionen (5,6 MeV/u; 3880 keV/μm)²³⁸U-Ionen (4,2 MeV/u; 14925 keV/μm)

Abb. 3.4: Prozentualer Anteil des DNA-Gehaltes als Funktion der Dosis in unterschiedlichen Fragment-Größenbereichen nach Bestrahlung mit verschiedenen Strahlenarten.

Die kleinen schwarzen Quadrate zeigen den DNA-Gehalt in den Fragment-Größenbereichen bei entsprechender Dosis an. Die Werte ergeben sich durch Integration des DNA-Gehaltes über die Bereichsgrenzen. Die gestrichelte Linie stellt die gefittete DNA-Verteilung beruhend auf dem RBM dar (i gibt die Induktionsrate in Br/(Gy*Gbp) an).

Die Fehler der Induktionsraten beruhen auf dem Standardfehler des Fittparameters i . Für den Fitt wurde der Dosishintergrund für jeden Bereich einzeln festgelegt und anschließend eine Regression nach Gleichung 2.4 mit i als freiem Parameter durchgeführt.

RBM an die Daten wieder. In Abbildung 3.5, in der die DSB-Induktionsraten als Funktion des Molekulargewichtes der dsDNA-Fragmente für verschiedene Strahlenarten dargestellt sind, werden die jeweiligen Mittel der Induktionsraten aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt. Beide Abbildungen zeigen, dass die Induktionsrate nach Röntgenbestrahlung weitestgehend unabhängig vom untersuchten Größenbereich ist. Lediglich bei Fragmenten zwischen 48 kbp und 390 kbp ist ein leichter Anstieg der Induktionsrate zu verzeichnen. So steigt sie von ca. 6 DNA-DSBs pro Gray und Gigabasenpaar ($\text{Br}/(\text{Gy} \cdot \text{Gbp})$) auf ca. 8 $\text{Br}/(\text{Gy} \cdot \text{Gbp})$.

Die Anwendung des RBM auf die DSB-Induktion nach Exponierung der DNA mit dicht ionisierender Strahlung ist limitiert, da diese Strahlung, wie gezeigt werden konnte (Löbrich *et al.* 1996; Kraxenberger *et al.* 1998; Höglund *et al.* 2000), DNA-DSBs nicht stochastisch verteilt erzeugt. Da jedoch die Teilchenbahnen selbst bei einer homogenen Bestrahlung der Zellen stochastisch verteilt durch den Zellkern treten, ist mit einem Anteil an dsDNA-Fragmenten zu rechnen, die auf DNA-DSBs zweier voneinander unabhängiger Teilchenbahnen beruhen. Demnach sind die einzelnen DNA-DSBs dieser Fragmente ebenso voneinander unabhängig induziert worden. dsDNA-Fragmente, generiert durch Röntgenstrahlung, beruhen im betrachteten Bereich hauptsächlich auf zwei voneinander unabhängigen DNA-DSBs. Demnach kann erwartet werden, dass Fragmentverteilung erzeugt durch dicht ionisierende Strahlungen einen Fragment-Anteil besitzen, der sich ähnlich wie die Fragmentverteilungen generiert durch Röntgenstrahlung verhält. Bei einem Fitt des RBM an die entsprechenden Induktionpunkte der verschiedenen Fragment-Größenbereiche kann daher erwartet werden, dass dieser „stochastische Anteil“ von dsDNA-Fragmenten, wie auch bei Röntgenstrahlung, sich durch eine vom Größenbereich unabhängige Induktionsrate auszeichnet. In Fragment-Größenbereichen, die Fragmente beinhalten, die durch ein einziges Teilchen generiert werden können und somit auf miteinander korrelierten DNA-DSBs beruhen, sollte ein „nicht stochastischer Anteil“ von dsDNA-Fragmenten erzeugt werden. Von diesem Anteil ist zu erwarten, dass er sich in einer stärkeren Variation der Induktionsrate von Fragmentbereich zu Fragmentbereich widerspiegelt. Diese erwartete Variation der Induktionsrate über die verschiedenen Fragment-Größenbereiche kann zum einen direkt auf die physikalischen Eigenschaften der Strahlenart zurückgeführt werden, wobei mit Zunahme des LET vermehrt kleine Fragmente erzeugt werden. Zum anderen ist es ebenso möglich, dass der biologische Aufbau der DNA einen Einfluss auf die Induktionsrate der dsDNA-Fragmente hat. Dieser Einfluss würde sich darin äußern, dass die Induktionsraten sich in bestimmten (in den gleichen) Fragment-

Größenbereichen unabhängig von den physikalischen Eigenschaften der Strahlenarten ändern.

In Abbildung 3.4 ist zu erkennen, dass das benutzte RBM in der Lage ist, die Induktion von dsDNA-Fragmente in allen Fragment-Größenbereichen und für jede dargestellte Strahlenart weitestgehend zu beschreiben. So ist für keinen der dargestellten Bereiche eine signifikante Diskrepanz zwischen den gemessenen Daten und dem Fit an das RBM feststellbar. Die Begründung hierfür kann darin liegen, dass das RBM nur auf spezifische Fragment-Größenbereiche angewendet wird und nicht über die gesamte Fragmentverteilung von 48 bis 3130 kbp, wie dies zumeist in bisherigen Veröffentlichungen der Fall ist. Aufgrund dieser guten Übereinstimmung der praktischen und theoretischen Daten scheint die Verwendung des RBM für die Berechnung der Induktionsraten legitim zu sein.

Ein Vergleich der DSB-Induktionsraten nach Röntgenbestrahlung mit den DSB-Induktionsraten nach Bestrahlung mit dicht ionisierenden Teilchen zeigt eine stärkere Variation der Induktionsraten, in Abhängigkeit von den untersuchten Fragment-Größenbereichen, für hoch-LET Teilchen auf (Abb. 3.5). So nimmt mit Zunahme des LET der Anstieg der Induktionsraten für kleine Fragmente deutlich zu. Während dieser nach Röntgenbestrahlung nur ca. 40% (von 6,2 Br/(Gy*Gbp) auf 8,5 Br/(Gy*Gbp)) beträgt, ist nach Bestrahlung der Zellen mit ^{12}C -Ionen die DSB-Induktionsrate von

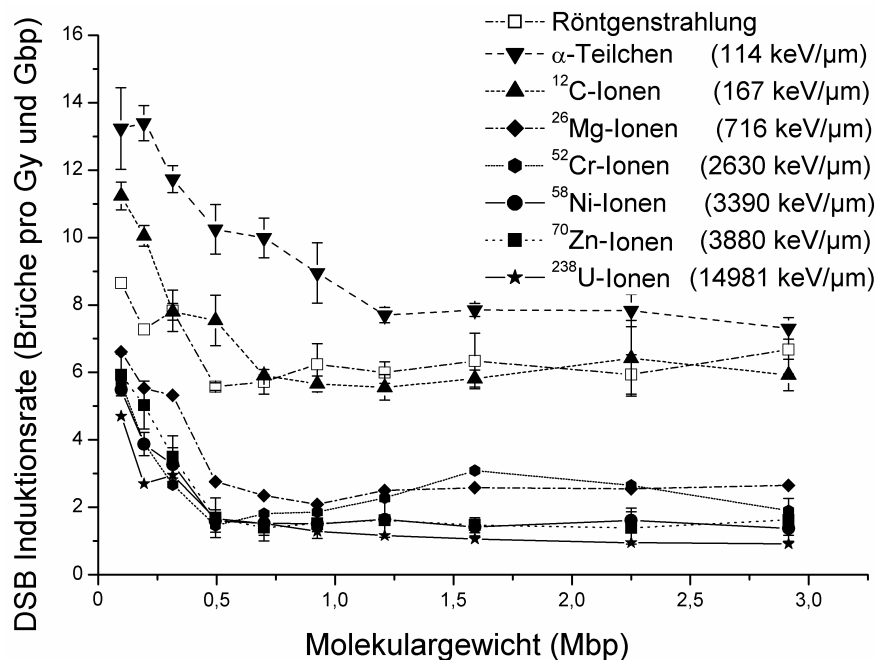


Abb. 3.5: DNA-DSB Induktionsraten stationärer Zellen für unterschiedliche Strahlenqualitäten in Abhängigkeit vom Molekulargewicht der generierten Fragmente. Die vorhandenen Fehlerbalken ergeben sich aus dem Standardfehler aus 2 bis 3 unabhängigen Experimenten.

ca. 5,5 Br/(Gy*Gbp) auf 11,7 Br/(Gy*Gbp) angestiegen. Dies entspricht einem Anstieg um 110%. Nach Bestrahlung der Zellen mit Uran-Ionen beträgt dieser sogar 410%. So steigt die Induktionsrate von 0,9 Br/(Gy*Gbp) auf 4,7 Br/(Gy*Gbp).

Zusätzlich ist aus Abbildung 3.5 ersichtlich, dass alle Strahlenarten relativ konstante Induktionsraten im Fragmentbereich zwischen 1 Mbp und 3 Mbp besitzen. Unterhalb 500 kbp ist hingegen eine signifikante Erhöhung der Induktionsraten beobachtbar. Da dieser Anstieg für alle benutzten Strahlenarten bei gleichem Molekulargewicht auftritt, scheinen die stark variierenden physikalischen Eigenschaften der ionisierenden Strahlenarten hierbei nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Vielmehr scheint dieses Verhalten auf einen biologischen Einfluss, wie z.B. den Einfluss einer höher geordneten Chromatinstruktur auf die Erzeugung dsDNA-Fragmente, hinzudeuten.

3.1.4 DNA-Fragmentverteilungen in G₀/G₁-Zellen – Qualitative Analyse

Die durch Röntgenstrahlung erzeugten dsDNA-Fragmente ab einer Länge von einigen Kilobasenpaaren beruhen hauptsächlich auf zwei voneinander unabhängigen Ionisationsclustern, wohingegen kürzere einzel- und doppelsträngige Fragmente durch einen einzelnen Ionisationscluster erzeugt werden können (Rydberg *et al.* 1998a). Daher sind die in dieser Arbeit untersuchten dsDNA-Fragmente generiert durch Röntgenstrahlung mit einer Länge von 50 kbp bis 3 Mbp hauptsächlich auf zwei unabhängig voneinander induzierte DNA-DSBs zurückführbar. Fragmente, welche auf zwei miteinander korrelierenden DNA-DSBs beruhen, sollten hingegen in dem untersuchten Fragment-Größenbereich seltener auftreten. Die resultierenden dsDNA-Fragmentverteilungen nach Röntgenbestrahlung besitzen in diesem Bereich jeweils nur ein detektierbares Maximum, dessen Verhalten in Abhängigkeit von der Dosis durch das RBM sehr gut beschrieben wird. Das Molekulargewicht des Maximums stellt die Fragmentlänge dar, an welchem der DNA-Gehalt (Anzahl der Fragmente mit einer spezifischen Größe multipliziert deren Länge) nach der jeweilig applizierten Dosis am größten ist. Dieser maximale DNA-Gehalt der Fragmentverteilungen verschiebt sich mit zunehmender Dosis hin zu kleineren Fragmentgrößen. In Abbildung 3.2 ist bei Separationsbedingungen für große Fragmente dieses Verhalten des Maximums in Abhängigkeit von der Dosis dargestellt (offene Pfeile), wobei der DNA-Gehalt gegen die Wanderungsstrecke der dsDNA-Fragmente aufgetragen ist. Deutlich sichtbar ist, dass das Maximum mit zunehmender Dosis immer weiter in das Gel hinein verschiebt ($\hat{=}$

längerer Wanderungsstrecke). Eine längere Wanderungsstrecke bedeutet gleichzeitig eine kleiner Fragmentgröße. Demnach verschiebt sich das Maximum mit zunehmender Dosis hin zu kleineren Fragmentgrößen.

dsDNA-Fragmentverteilungen als Funktion der Wanderungsstrecke nach Bestrahlung mit hoch-LET Teilchen besitzen hingegen eine völlig andere Charakteristik. In Abbildung 3.2 ist das Wanderungsverhalten der detektierbaren Maxima in Abhängigkeit von der Dosis nach Bestrahlung mit verschiedenen Ionen aufgezeigt. Deutlich erkennbar sind bei unterschiedlichen Dosen für alle untersuchten dicht ionisierenden Strahlenarten zwei verschiedene Maxima. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass dsDNA-Fragmente auf mindestens zweierlei Art und Weise generiert werden können, wobei die Korrelation der beiden DNA-DSBs eines Fragmentes zueinander eine entscheidende Rolle zu spielen scheint.

So verhält sich eine Fragmentart (offene Pfeile) entsprechend den beobachteten Verteilungen erzeugt durch dünn ionisierende Strahlung. Mit Zunahme der Dosis verschiebt sich das mittlere Molekulargewicht hin zu kleineren Fragmenten. Da diese Verschiebung des Maximums der Verschiebung des Maximums nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen ähnelt, ist dies ein Indiz dafür, dass diese erste Fragmentart auf zwei voneinander unabhängig induzierten, nicht miteinander korrelierenden, DNA-DSBs zurückzuführen ist. Diese dsDNA-Fragmente scheinen demnach hauptsächlich auf DNA-DSBs zweier unabhängiger Teilchenbahnen (Tracks) zu beruhen und werden daher im Weiteren **inter-Track-Fragmente** genannt. Da die Induktion dieser Fragmente rein stochastisch ist (stochastische Verteilung der Teilchenbahnen über die bestrahlte Fläche), enthalten diese Verteilungen keine strukturellen Informationen über den Chromatinaufbau. Vielmehr überdecken sie (schraffierte Pfeile in Abb. 3.2) mit zunehmender Dosis die zweite Art an Fragmenten (ausgefüllte Pfeile in Abb. 3.2).

Das Molekulargewicht des maximalen DNA-Gehaltes dieser generierten zweiten Fragmentgruppe bleibt trotz Zunahme der Dosis unverändert, nur die Anzahl an Fragmenten (Signalintensität) nimmt deutlich zu. Dies deutet darauf hin, dass diese Fragmente auf DNA-DSBs beruhen, welche durch eine einzige Teilchenbahn induziert werden und daher auf miteinander korreliert erzeugte DNA-Läsionen zurückführbar sind. So induziert ein einziger Track ein bestimmtes DSB-Verteilungsmuster, das zu einer spezifischen dsDNA-Fragmentverteilung führt. Ein zweiter unabhängiger Track durch den Zellkern generiert aber genau die gleiche Verteilung, so dass die Summe beider Tracks ein vom Molekulargewicht unabhängiges Maximum ergibt. Diese **intra-Track-Fragmente** sind demnach von der Dosis unabhängig, wodurch die Generierung dieser

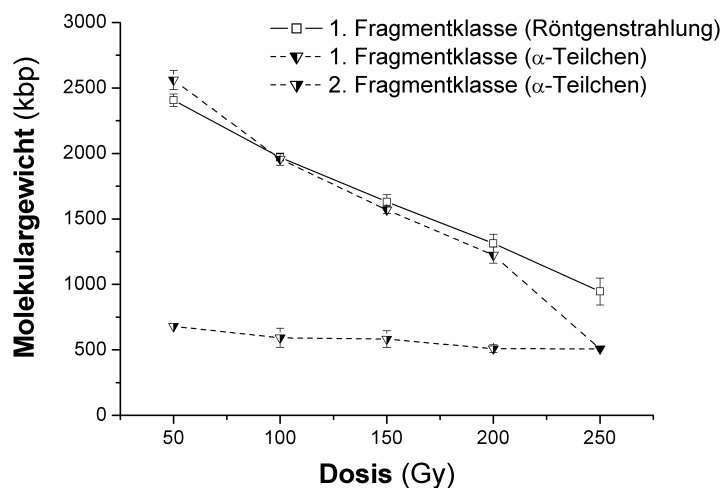


Abb. 3.6: Abhängigkeit der Maxima der DNA-Masseverteilungen von der applizierten Dosis nach Röntgen- und α -Teilchen Exposition.

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes wurde jedes Experiment einzeln an die Größenmarker gefittet. Die abgelesenen Wanderungsstrecken der Maxima der Intensitätsverteilungen konnten so direkt einem spezifischen Molekulargewicht zugeordnet werden. Die optische Ermittlung der Maxima ist sehr gut reproduzierbar.

dsDNA-Fragmente nur von den physikalischen Eigenschaften der Strahlung oder aber vom strukturellen Aufbau der DNA abhängig sein kann.

Die qualitative Analyse ist ein vergleichsweise subjektives Verfahren, bei dem die Maxima der DNA-Masse-Verteilungen ermittelt und deren Abhängigkeit von der Dosis bzw. Fluenz untersucht wird. Abbildung 3.6 zeigt das beobachtete Verhalten der Maxima der Intensitätsverteilungen nach Röntgen- und α -Teilchen-Bestrahlung, wobei die Wanderungsstrecke in das entsprechende Molekulargewicht umgerechnet wurde. In dieser Graphik spiegelt sich die oben beschriebene Charakteristik der beiden Fragmentklassen und der unterschiedlich dicht ionisierenden Strahlenarten wieder. Bei Röntgenstrahlung ist nur eine Fragmentklasse detektierbar. Ihr Maximum verschiebt sich mit Zunahme der Dosis zu kleinerem Molekulargewicht hin. So wandert der größte Anteil der DNA bei einer Dosis von 150 Gy ca. 53 Längeneinheiten weit aus der Tasche (Abb. 3.2), dies entspricht einem Molekulargewicht von ca. 1,6 Mbp. Nach 250 Gy Röntgenstrahlung befindet sich dieses Maximum weitere 13 Längeneinheiten von der Tasche entfernt, womit es sich zu kleineren dsDNA-Fragmenten hin verschoben hat (0,9 Mbp). α -Teilchen, wie auch alle anderen Teilchenstrahlungen, besitzen ebenfalls inter-Track-Fragmente (Abb. 3.2: offene Pfeile), zusätzlich jedoch noch eine zweite Fragmentklasse, welche von der Dosis unabhängig ist (Abb. 3.2: ausgefüllte Pfeile).

Um den physikalischen Einfluss der Strahlung bzw. den biologischen Einfluss der Chromatinstruktur auf die Induktion der intra-Track-Fragmente untersuchen zu können,

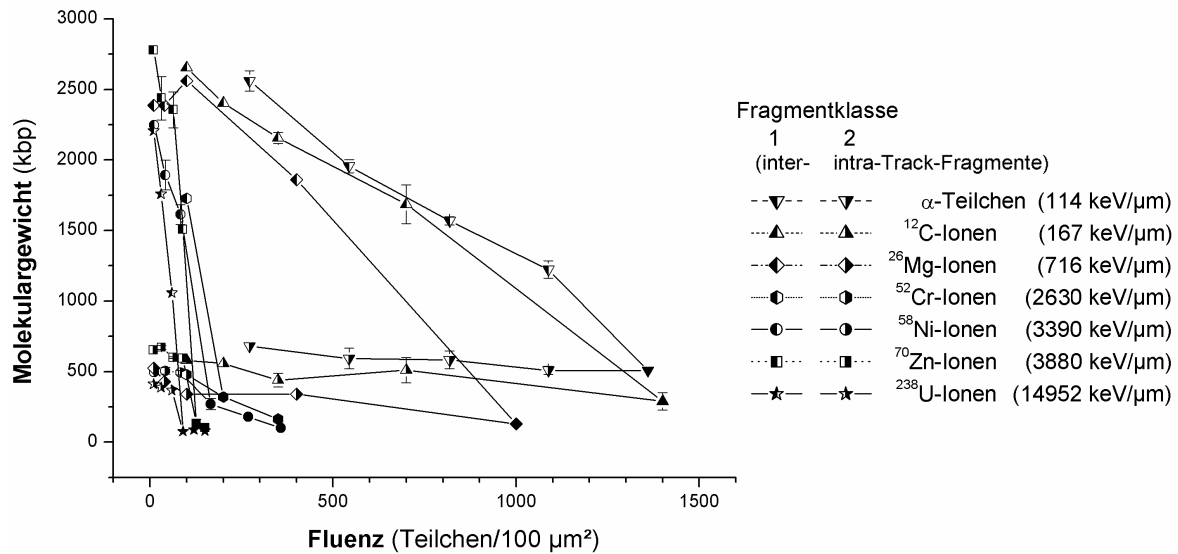


Abb. 3.7: Einfluss des LET und der Fluenz auf die Position der Maxima der DNA-Masseverteilungen generiert durch hoch-LET Bestrahlung primärer menschlicher Fibroblasten. Die Fehlerbalken ergeben sich aus dem Standardfehler aus mindestens zwei Experimenten.

wurden Experimente mit unterschiedlichen Strahlenarten durchgeführt und analog ausgewertet (Abb. 3.7). Zur besseren Veranschaulichung ist das Molekulargewicht gegen die Fluenz statt der Dosis aufgetragen. Es ist erkennbar, dass alle dargestellten Ionen beide Klassen an Fragmenten besitzen. Abbildung 3.7 verdeutlicht die Abhängigkeit der inter-Track-Fragmente (linksseitig gefüllte Symbole) von der Ionisationsdichte, dem LET, eines Teilchens, also von den physikalischen Eigenschaften der Strahlung. So nimmt mit zunehmendem LET die Steigung, welche ein Maß für die Interaktion der DNA-DSBs zwischen zwei Teilchenbahnen ist, vom Betrag her zu. Generell gilt hierbei: Je steiler die Steigung ist, desto mehr Interaktionen finden zwischen zwei Teilchenbahnen statt. Die Ursache liegt in der Ionisationsdichte der unterschiedlichen Strahlenarten: Je mehr Ionisationen ein Teilchen entlang seines Weges erzeugt, desto mehr DNA-DSBs werden generiert. Dies führt wiederum zu einer wahrscheinlicheren Interaktion der DNA-DSBs zwischen verschiedenen Teilchenbahnen. Beispielsweise werden so etwa 1100 ¹²C-Ionen pro 100 µm² benötigt (mittlere Zellkernfläche: 155µm²), um einen maximalen DNA-Gehalt an inter-Track-Fragmenten mit einer Fragmentgröße von 1 Mbp zu erzeugen. Die dichter ionisierenden Magnesium-Ionen benötigen aufgrund der angestiegenen Interaktion der DNA-DSBs zwischen zwei Teilchenbahnen dafür lediglich 750 Ionen, und nur noch ca. 100 Zink-Ionen je Zellkern sind notwendig für denselben Effekt.

Eine Analyse der intra-Track-Fragmente (rechtsseitig gefüllte Symbole) ergibt im Wesentlichen eine Unabhängigkeit des Molekulargewichts von den physikalischen

Eigenschaften der Strahlung. Es findet sich bei jeder Strahlenart eine Häufung an Fragmenten, die ein Molekulargewicht von ca. 500 kbp besitzen. Dies ist mit der quantitativen Analyse konsistent, da hier ebenfalls ein signifikanter Anstieg der Induktionsrate bei ca. 500 kbp gefunden wurde, welcher ebenfalls unabhängig von der Strahlenqualität ist. Da die physikalischen Eigenschaften der verschiedenen hoch-LET Strahlungen sich stark voneinander unterscheiden, kann daraus der Schluss gezogen werden, dass eine biologische Strukturkomponente für diese charakteristische Größe der dsDNA-Fragmente verantwortlich ist.

3.2 Induktion von doppelsträngigen DNA-Fragmenten in exponentiell wachsenden und in mitotisch angereicherten Zellkulturen

Metaphasechromosomen unterscheiden sich von Interphasechromosomen in einer etwa 100fach stärkeren Kondensation der DNA. Die ursprünglich lineare Länge der DNA wird dabei insgesamt um den Faktor 10 000 reduziert (Snustad und Simmons 1999). In den folgenden Untersuchungen soll festgestellt werden, ob diese Kondensation auf eine strukturelle Änderung höher geordneter Chromatinorganisationen zurückzuführen ist oder ob sie auf anderen Strukturelementen beruht. Bei einer Änderung höher geordneter Chromatinstrukturen wäre zu erwarten, dass durch diese veränderte räumliche Ordnung die durch Strahlung generierten DNA-DSBs zu anderen Fragmentverteilungen führen. Die Induktionsraten, als auch die Maxima der DNA-Masse-Verteilungen der intra-Track Fragmente könnten somit verschoben sein. Im Falle einer unveränderten tertiären Chromatinstruktur im betrachteten Größenbereich kann davon ausgegangen werden, dass die charakteristischen Fragmentverteilungen der Interphasechromosomen beibehalten werden.

Die Analyse dsDNA-Fragmentverteilungen erfolgte analog der Auswertung von Experimenten mit ruhenden Zellen. Da zur besseren Synchronisation der Zellen in der Mitose eine schnell proliferierende Zelllinie notwendig war, wurden diese Experimente mit einer Blasenkarzinomzelllinie (MGH-U1) durchgeführt.

3.2.1 Anreicherung und Messung mitotischer Zellen

Primäre menschliche Fibroblasten können in konfluenten Monolayern einen Anteil von bis zu 98% der Zellen in der G_0/G_1 -Phase des Zellzyklus erreichen. In diesem Zellzyklusstadium liegen die Chromosomen verglichen mit der Mitose in einer weitestgehend relaxierten Form vor. Für Untersuchungen der tertiären Struktur des Chromatins in lebenden Zellen in Abhängigkeit von dessen Kondensationsgrad scheinen mitotische Zellen am günstigsten zu sein. Da, im Gegensatz zu Untersuchungen auf Einzelzellebene, in dieser Arbeit die Chromatinstruktur mittels PFGE untersucht wurde, ist es aufgrund der für das Gel benötigten DNA-Menge notwendig, die Zellen in ihrer mitotischen Zellzyklusphase anzureichen. Zur effizienten Synchronisation wurde eine schnell proliferierende Blasenkarzinomzelllinie (MGH-U1) verwendet, welche mit Nocodazol behandelt wurde. Das Zellgift zerstört die filamentäre Struktur der Mikrotubuli und führt dadurch zu einer gleichmäßigen zytoplasmatischen Verteilung des Tubulins in der Zelle. Dies verhindert die Bildung des Spindelfaserapparates während der Mitose, so dass die Zellen während dieser Zellzyklusphase arretieren. Abbildung 3.8 stellt eine typische Zellzyklusverteilung von MGH-U1 Zellen nach verschiedenen Einwirkzeiten von Nocodazol (100 ng/ml) dar. Die prozentualen Anteile der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen sind gegen die Einwirkzeit von Nocodazol aufgetragen. Ermittelt wurden diese Daten durch die Messung des DNA-Gehaltes der Zellen an einem Durchflusszytometer. Aus Abbildung 3.8 ist ersichtlich, dass sich bei einer Konzentration von 100 ng/ml Nocodazol mit einer Einwirkzeit von 8 h bis 24 h eine maximale G_2/M -

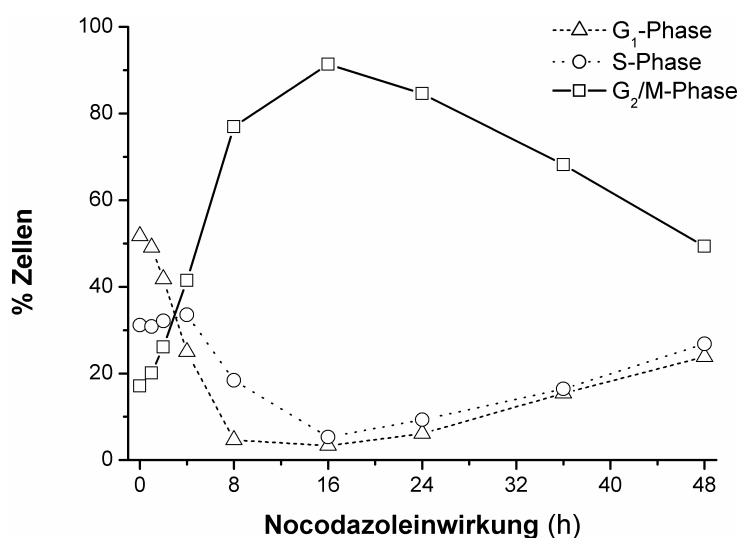


Abb. 3.8: Zellzyklusverteilung nach unterschiedlichen Einwirkzeiten von Nocodazol. Durchflusszytometrische Analyse nach einer Propidiumjodidfärbung von MGH-U1 Zellen.

Population entwickelt. Dabei arretieren ca. 80% der MGH-U1 Zellen in der G₂/M-Phase des Zellzyklus.

Der beobachtbare Rückgang der G₂/M-Population nach 24 h kann möglicherweise auf den Verbrauch des Nocodazols bzw. dessen Zerfall zurückgeführt werden. Dadurch können die arretierten Zellen ihren Spindelfaserapparat wieder aufbauen und ihren Zellzyklus vollenden.

Durch eine Markierung der DNA mit Propidiumjodid (Crissman *et al.* 1976; Crissman und Steinkamp 1982) ergibt jeder Zellkern bei der Messung im Durchflusszytometer ein exakt definiertes Signal (*Count*). Anhand des DNA-Gehaltes (entspr. Propidiumjodid-Gehalt) der gemessenen Zellen ist eine Zuordnung der Signale zur jeweiligen Zellzyklusphase möglich: G₁ besitzt einen einfachen DNA-Gehalt. Während der Synthesephase nimmt dieser zu, bis er sich in der G₂-Phase verdoppelt hat. Durch diese Trennung kann der prozentuale Anteil der Zellkerne in einer bestimmten Phase bestimmt werden. Abbildung 3.9A zeigt durchflusszytometrische Histogramme unbehandelter und mit Nocodazol behandelter MGH-U1 Zellen. Die Zellanzahl (Counts) ist als Funktion des DNA-Gehaltes dargestellt. Deutlich sichtbar ist die Anreicherung von MGH-U1 Zellen in der G₂/M-Phase des Zellzyklus nach Behandlung der Zellen mit Nocodazol. In der unbehandelten Zellkultur befindet sich der Großteil der Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklus. Neben den Propidiumjodid-Signalen der unterschiedlichen Zellzyklusphasen intakter Zellen sind in Abbildung 3.9A auch Signale mit einem geringeren DNA-Gehalt zu erkennen. Diese rühren von markierten DNA-haltigen Zellfragmenten her.

Zur Unterscheidung zwischen der G₂- und der M-Phase im Peak der mit Nocodazol behandelten Zellen aus Abbildung 3.9A wurde eine Metaphasepräparation dieser Zellen durchgeführt (Abb. 3.9B). Dargestellt ist eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme

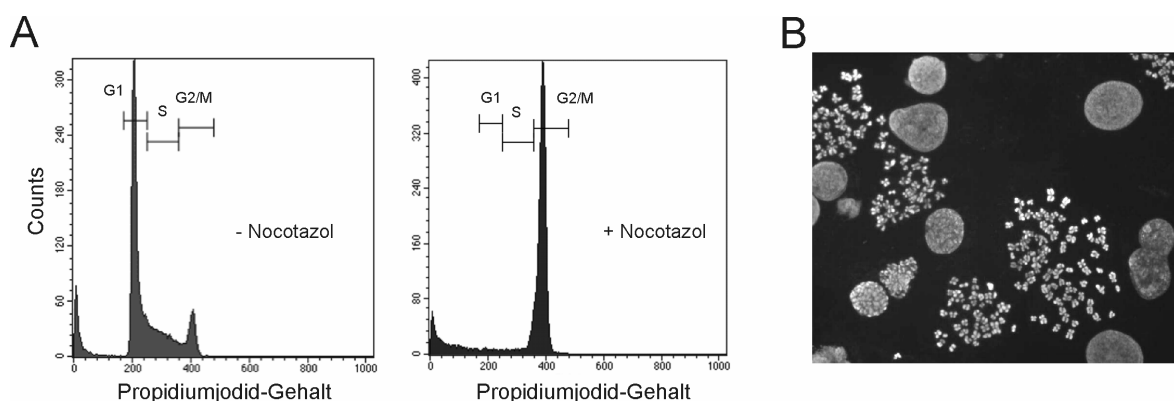


Abb. 3.9: Anreicherung mitotischer MGH-U1.

(A) DNA-Histogramme ohne bzw. nach 16 h Nocodazol-Behandlung, (B) Metaphasepräparat mit gespreiteten Chromosomen und noch intakten mitotischen Zellkernen nach 24 h Nocodazol-Behandlung (DAPI-Färbung).

DAPI gefärbter Zellkerne. Durch das Auftropfen der Zellsuspension auf einen Objektträger sind sowohl gut aufgespreitete Chromosomen (Zellen in der M-Phase) als auch noch geschlossene Zellkerne mit kondensierten Chromosomen (Zellen ebenfalls in der M-Phase) erhalten worden. Die Summe dieser beiden Zustände weist einen Anteil von ca. 70% an Zellen mit kondensierten Chromosomen auf.

3.2.2 Direkte DNA-Doppelstrangbruch-Quantifizierung

Die Ermittlung der DSB-Induktionsraten durch die direkte DSB-Quantifizierung wurde analog zur direkten DSB-Quantifizierung in stationären MRC-5 Zellen durchgeführt (siehe Kapitel 3.1.2). Es wurden die gleichen Arbeitsschritte für jede Fluenz bzw. Dosis der untersuchten Strahlenarten durchgeführt. Nachdem die Anzahl der induzierten DNA-DSBs in jedem Fragment-Größenbereich für die exponentiell wachsende Kultur (- Nocodazol) bzw. für die Kultur mit mitotisch angereicherten Zellen (+ Nocodazol) nach Gleichung 2.2 berechnet worden ist, konnten diese als Funktion der Fluenz aufgetragen werden (Abb. 3.10). Die direkten Induktionsraten (Tabelle 3.2) ergaben sich durch eine lineare Regression an die Datenpunkte.

Wie bereits anhand der Induktionsraten stationärer MRC-5 Zellen gezeigt werden konnte, nimmt die Anzahl der durch ein Teilchen induzierten DNA-DSBs mit zunehmendem LET der Teilchen zu. Die Anzahl der durch ein Teilchen induzierten

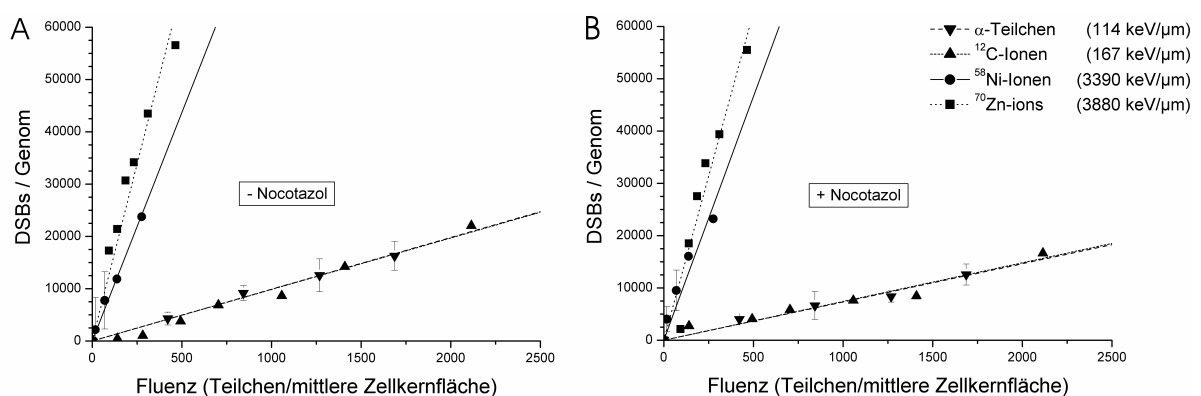


Abb. 3.10: Induktion von DNA-DSBs in exponentiell wachsenden (A) und in mitotisch angereicherten (B) MGH-U1 Zellen als Funktion der Fluenz.

Den Berechnungen der Datenpunkte liegen zum besseren Vergleich mit primären Fibroblasten (MRC-5) ein diploides Genom (6,2 Gbp), sowie eine angenommene mittlere Zellkernfläche von $155 \mu\text{m}^2$ zugrunde. Die Fehlerbalken stellen den SEM aus zwei bis drei Experimenten dar. Die Geraden beruhen auf einer linearen Regression an die Datenpunkte.

Tabelle 3.2: Durch eine direkte DSB-Quantifizierung ermittelte Induktionsraten nach Bestrahlung von exponentiell wachsenden (- Nocodazol) und mitotisch angereicherten (+ Nocodazol) MGH-U1 Zellen mit unterschiedlichen Strahlenarten.

Strahlenart	LET (keV/ μm)	DSB – Anzahl \pm SE ^{a,c} (DSBs/Gy/Zelle)		DSB – Anzahl \pm SE ^{a,b,c} (DSBs/Teilchen/Zellkern)	
		- Nocodazol	+ Nocodazol	- Nocodazol	+ Nocodazol
Röntgenstrahlung		52,3 \pm 1,9	48,1 \pm 6,5		
α -Teilchen	114	83,5 \pm 1,7	61,7 \pm 2,5	9,9 \pm 0,2	7,3 \pm 0,3
^{12}C -Ionen	167	57,2 \pm 2,4	42,5 \pm 2,4	9,8 \pm 0,4	7,4 \pm 0,4
^{58}Ni -Ionen	3390	24,9 \pm 0,9	26,5 \pm 2,5	87,3 \pm 2,9	93,2 \pm 8,8
^{70}Zn -Ionen	3880	33,7 \pm 1,6	33,7 \pm 1,4	135,2 \pm 6,5	135,1 \pm 5,8

^a – 6,2 Gbp pro diploider Zelle in der G₀/G₁-Phase.

^b – Bei Annahme einer mittleren Zellkernfläche von 155 μm^2 .

^c – Standardfehler der linearen Regression.

DNA-DSBs scheint hierbei weitestgehend unabhängig vom Zellzyklus zu sein. So ist aus Tabelle 3.2 keine eindeutige Tendenz dafür zu erkennen, dass dicht ionisierende Strahlenarten in Zellen, welche mitotisch angereichert sind, eine andere Induktionsrate aufweisen als in Zellen, welche normal proliferieren. Das gleiche Verhalten ist auch nach Röntgenbestrahlung zu beobachten. So werden unabhängig vom Zellzyklus in MGH-U1 Zellen, wie auch in stationären MRC-5 Zellen, durch 1 Gy Röntgenstrahlung ca. 8 Br/Gbp induziert.

3.2.3 DNA-Fragmentverteilungen während des Wachstums und der Mitose – Quantitative Analyse

Wie auch in ruhenden Zellen erfolgte in Experimenten mit mitotisch angereicherten Zellen eine quantitative Analyse der erhaltenen dsDNA-Fragmentverteilungen. Nach Bestrahlung der Zellen mit Röntgen- oder Teilchenstrahlung, anschließender Trypsinierung, Einbettung in Agaroseplugs, Lyse der Zellen, PFGE und Southern-Hybridisierung mit genomischer DNA konnte der DNA-Gehalt in verschiedenen Größenbereichen ermittelt werden. Da eine andere Zelllinie verwendet wurde, war es notwendig, nicht nur eine mitotisch angereicherte Population zu verwenden, sondern zum Vergleich musste zusätzlich eine exponentiell wachsende Kultur analysiert werden. Durch die Verwendung der exponentiellen Kultur ist es auch möglich, eventuelle

Röntgenstrahlung (95 keV)

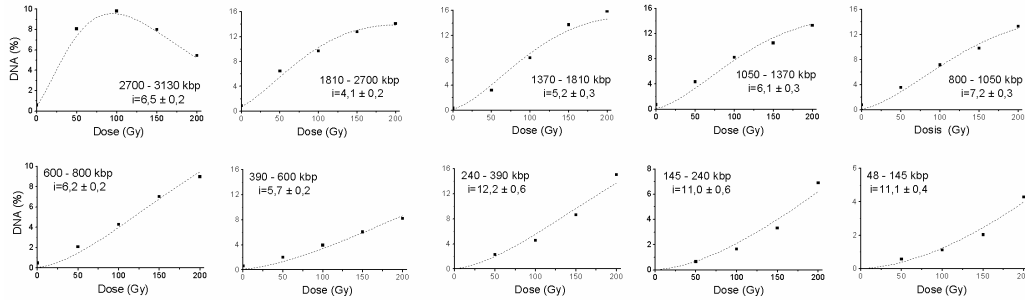
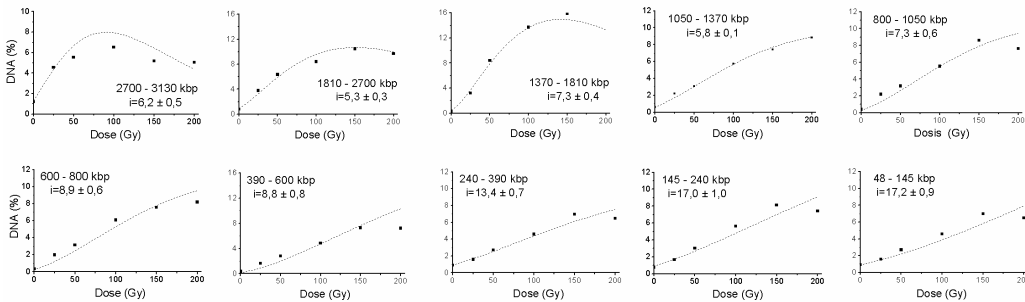
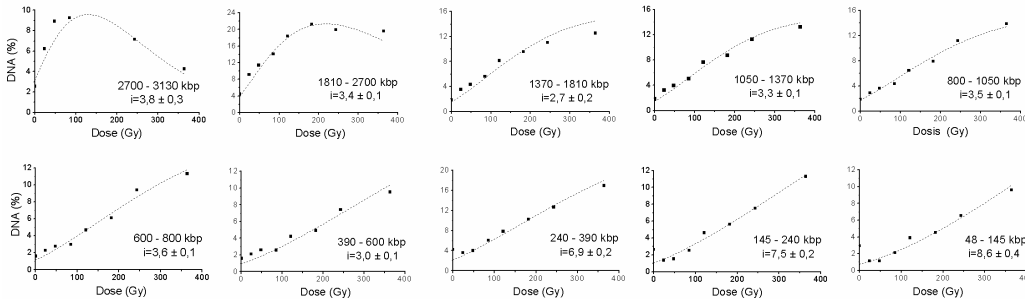
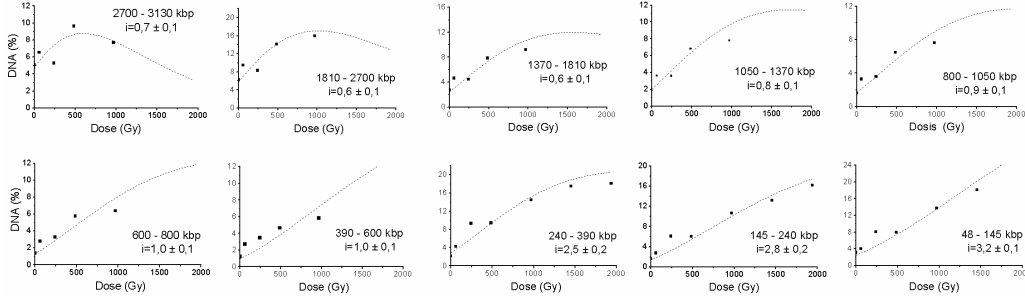
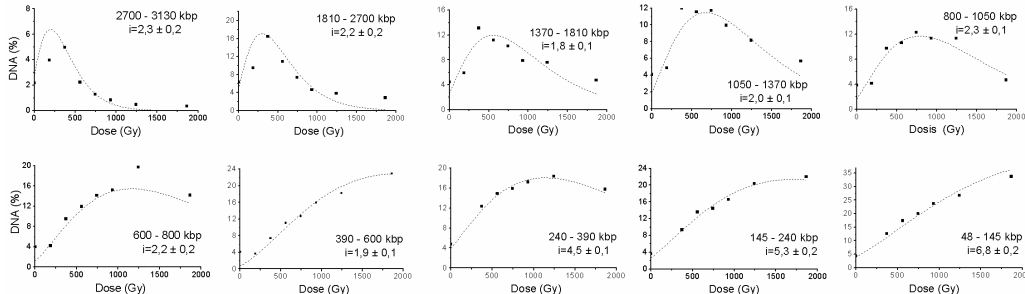
 α -Teilchen (0,92 MeV/u; 114 keV/ μ m) ^{12}C -Ionen (9,9 MeV/u; 167 keV/ μ m) ^{58}Ni -Ionen (6,2 MeV/u; 3390 keV/ μ m) ^{70}Zn -Ionen (5,6 MeV/u; 3880 keV/ μ m)

Abb. 3.11: Exponentiell wachsenden MGH-U1 Zellen: Prozentualer Anteil des DNA-Gehaltes als Funktion der Dosis in unterschiedlichen Fragment-Größenbereichen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen, α -Teilchen, ^{12}C -, ^{58}Ni - und ^{70}Zn -Ionen.

Die kleinen schwarzen Quadrate zeigen den DNA-Gehalt in den Fragment-Größenbereichen bei entsprechender Dosis an. Die Werte ergaben sich durch Integration des DNA-Gehaltes über die Bereichsgrenzen. Die gestrichelte Linie stellt die gefittete DNA-Masseverteilung beruhend auf dem RBM dar (i gibt die Induktionsrate in DNA-DSBs pro Zelle und Gbp an).

Die Fehler der Induktionsraten beruhen auf dem Standardfehler des Fittes an das RBM. Für den Fitt wurde der Dosishintergrund für jeden Bereich einzeln festgelegt und anschließend eine Regression nach Gleichung 2.4 mit i als freiem Parameter durchgeführt.

Röntgenstrahlung (95 keV)

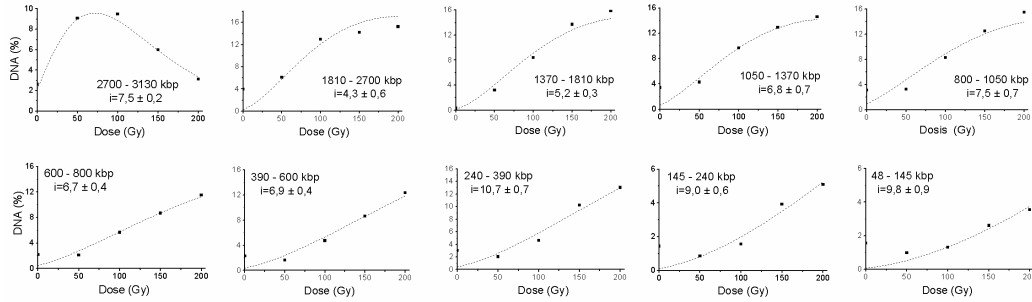
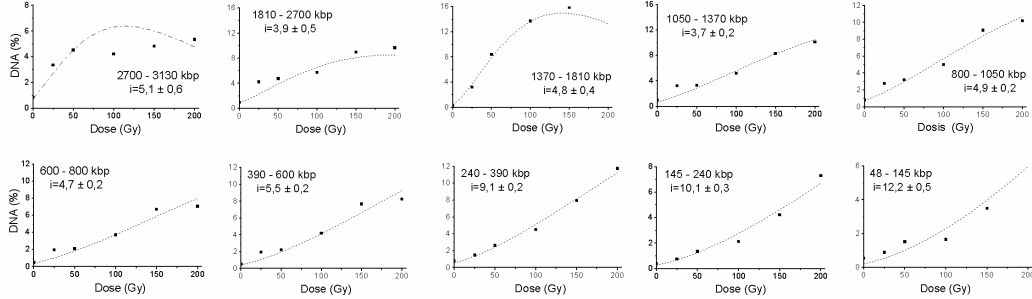
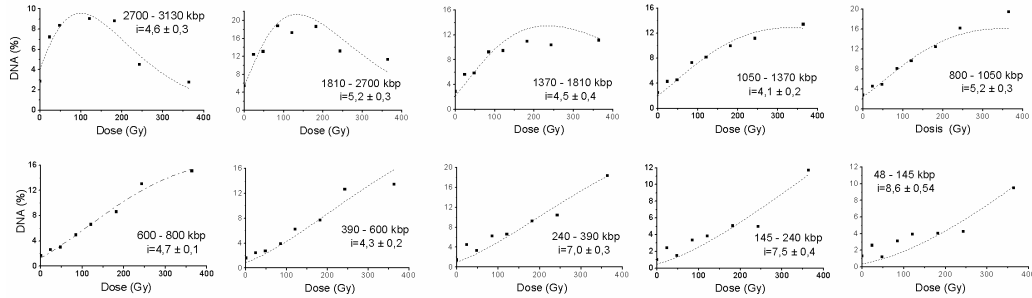
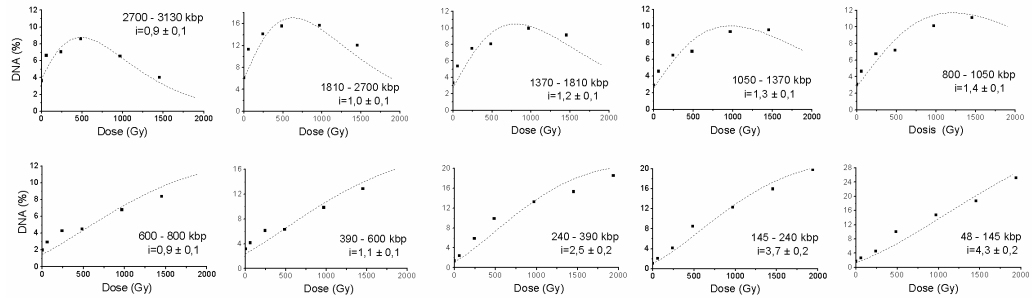
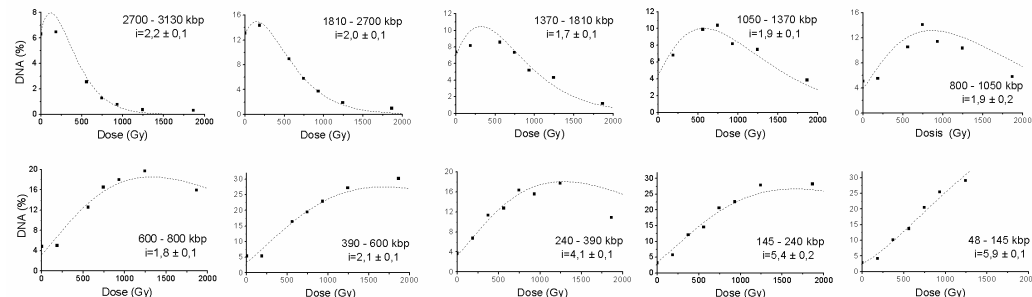
 α -Teilchen (0,92 MeV/u; 114 keV/ μ m) ^{12}C -Ionen (9,9 MeV/u; 167 keV/ μ m) ^{58}Ni -Ionen (6,2 MeV/u; 3390 keV/ μ m) ^{70}Zn -Ionen (5,6 MeV/u; 3880 keV/ μ m)

Abb. 3.12: Mitotisch angereicherten MGH-U1 Zellen: Prozentualer Anteil des DNA-Gehaltes als Funktion der Dosis in unterschiedlichen Fragment-Größenbereichen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen, α -Teilchen, ^{12}C -, ^{58}Ni - und ^{70}Zn -Ionen.

Die kleinen schwarzen Quadrate zeigen den DNA-Gehalt in den Fragment-Größenbereichen bei entsprechender Dosis an. Die Werte ergaben sich durch Integration des DNA-Gehaltes über die Bereichsgrenzen. Die gestrichelte Linie stellt die gefittete DNA-Masseverteilung beruhend auf dem RBM dar (i gibt die Induktionsrate in DNA-DSBs pro Zelle und Gbp an).

Die Fehler der Induktionsraten beruhen auf dem Standardfehler des Fittes an das RBM. Für den Fitt wurde der Dosishintergrund für jeden Bereich einzeln festgelegt und anschließend eine Regression nach Gleichung 2.4 mit i als freiem Parameter durchgeführt.

Unterschiede in der Induktion dsDNA-Fragmente zwischen primären menschlichen Fibroblasten (MRC-5) und der benutzten Tumorzelllinie zu identifizieren.

In Abbildung 3.11 ist der prozentuale DNA-Gehalt verschiedener Größenintervalle von exponentiell wachsenden MGH-U1 Zellen gegen die Dosis aufgetragen. Zum Zeitpunkt der Bestrahlung befanden sich mindestens 50% der Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklus. Die restlichen 50% teilten sich zu nahezu gleichen Teilen in der S- und G₂-Phase auf. Die durch das RBM ermittelten Induktionsraten können somit recht gut mit primären Fibroblasten (MRC-5) verglichen werden. Ein Vergleich der Abbildung 3.13A mit Abbildung 3.5, in denen jeweils die Induktionsraten verschiedener Strahlenarten gegen das mittlere Molekulargewicht der verschiedenen Fragment-Größenbereiche aufgetragen ist, lässt erkennen, dass die Induktionsraten von MRC-5 und MGH-U1 Zellen sich kaum voneinander unterscheiden. Dies betrifft sowohl die Werte der Induktionsraten selbst, als auch ihr Verhalten über die verschiedenen Größenbereiche. Wie stationäre MRC-5 Zellen zeigen auch exponentiell wachsende Tumorzellen einen

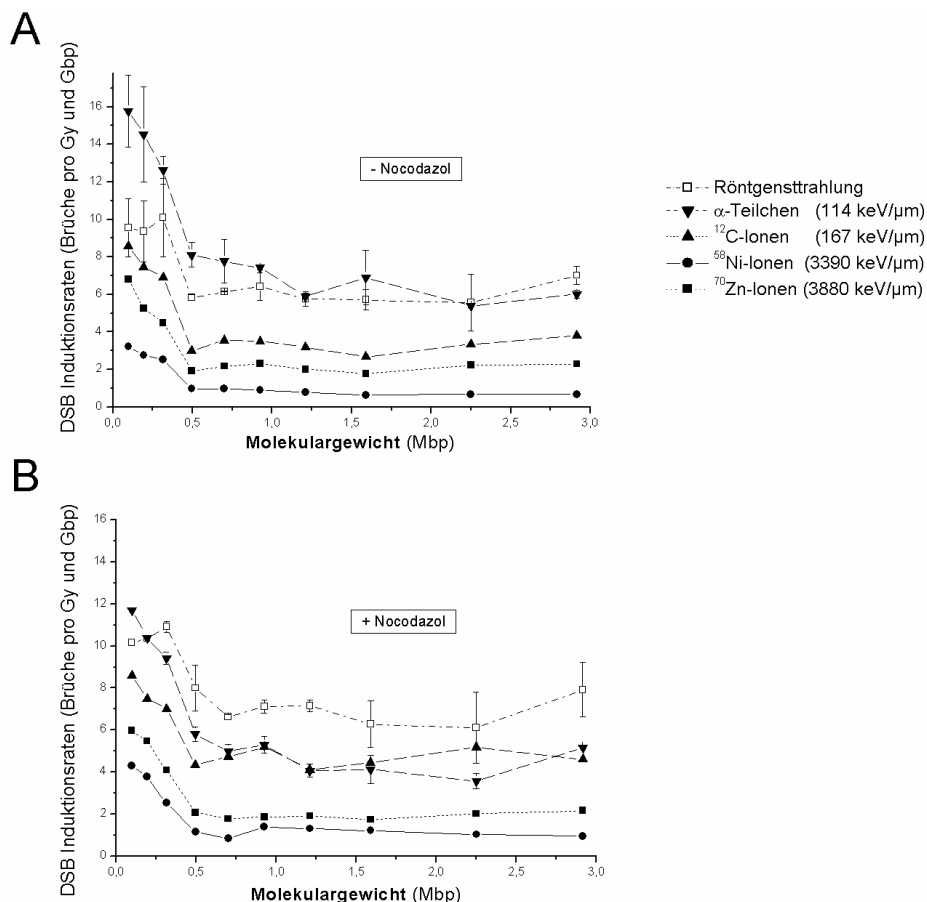


Abb. 3.13: DNA-DSB Induktionsraten unterschiedlicher Strahlenqualitäten als Funktion des Molekulargewichts für exponentiell wachsende (A) und mitotisch angereicherte (B) MGH-U1 Zellen.

Die vorhandenen Fehlerbalken beruhen auf dem Standardfehler aus 2 unabhängigen Experimenten.

signifikanten Anstieg der Induktionsrate unterhalb einer Fragmentgröße von 500 kbp. Dies ist ein Indiz dafür, dass im betrachteten Größenbereich die höher geordnete Chromatinorganisation in dieser Zelllinie sich nicht von der Chromatinorganisation in primären menschlichen Fibroblasten unterscheidet.

Durch eine 16 h – 24stündige Behandlung mit Nocodazol konnten ca. 80% der Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus angereichert werden (siehe Abb. 3.8). Nach Aufarbeitung der Proben ergaben sich für verschiedene Fragmentintervalle die in Abbildung 3.12 gezeigten Werte des DNA-Gehaltes als Funktion der Dosis. Eine Zusammenfassung der Induktionsraten aller untersuchten Fragmentbereiche für exponentiell wachsende und mitotisch angereicherte Zellen ist in Abbildung 3.13 zu sehen. Die dargestellten Fehlerbalken stellen den Standardfehler aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten dar. Ein Vergleich der exponentiell wachsenden (- Nocodazol) (Abb. 3.13A) mit der mit Nocodazol behandelten Population (mitotisch angereichert; + Nocodazol) (Abb. 3.13B) zeigt für jede Strahlenart separat betrachtet, dass das Verhalten der Induktionsraten weitestgehend unabhängig von den untersuchten Zellzyklusphasen ist. So zeigen exponentiell wachsende, wie auch mitotisch angereicherte Zellen einen deutlichen Anstieg der Induktionsrate für Fragmente, welche kleiner als 500 kbp sind. Große Fragmente zeigen hingegen kaum eine Variation der DSB-Induktionsraten in den betrachteten Fragment-Größenbereichen. Durch diese Ergebnisse werden die nach Bestrahlung primärer menschlicher Fibroblasten erhaltenen Resultate bestätigt. Zugleich deutet dies darauf hin, dass die biologische Strukturkomponente, welche sich für die charakteristische Größe von ca. 500 kbp der induzierten dsDNA-Fragmente verantwortlich zeichnet, durch den Zellzyklus unverändert bleibt.

3.2.4 DNA-Fragmentverteilungen während des Wachstums und der Mitose – Qualitative Analyse

Entsprechend der qualitativen Analyse der dsDNA-Fragmentverteilungen in ruhenden MRC-5 Zellen erfolgte auch mit MGH-U1 Zellen eine Betrachtung des Wanderungsverhaltens der Maxima des DNA-Gehaltes nach Exposition unterschiedlich dicht ionisierender Strahlungen. Es konnten hier ebenfalls sowohl inter- als auch intra-Track-Fragmente detektiert werden. Eine Gegenüberstellung der beiden induzierten Fragmentarten nach Bestrahlung mit α -Teilchen und Röntgenstrahlen in exponentiell

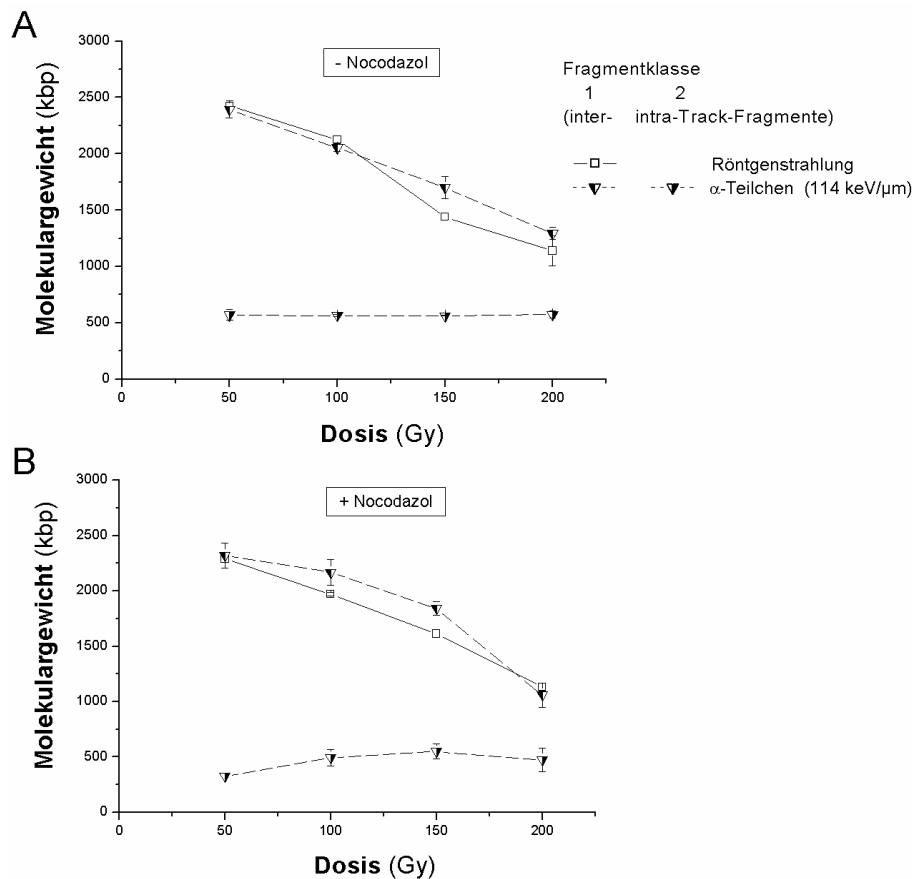


Abb. 3.14: Einfluss locker und dicht ionisierender Strahlung, sowie der Dosis auf die Position der Maxima des DNA-Gehaltes generiert durch hoch-LET Bestrahlung in exponentiell wachsenden (A) und mitotisch angereicherten (B) MGH-U1 Zellen.

Die vorhandenen Fehlerbalken beruhen auf dem Standardfehler aus zwei unabhängigen Experimenten.

wachsenden und in mitotisch angereicherten Zellkulturen ist in Abbildung 3.14 zu sehen.

Wie in Abbildung 3.7 für MRC-5 Zellen in der G_0/G_1 -Phase des Zellzyklus sind in Abbildung 3.15 für mehrere verschiedene Strahlenarten die zwei Maxima des DNA-Gehaltes gegen die Fluenz aufgetragen. Es konnten die Ergebnisse, welche durch Bestrahlung primärer humaner Zellen erzielt wurden, wiederum bestätigt werden. So spiegeln sich die physikalischen Eigenschaften ionisierender Strahlung im Verhalten der inter-Track-Fragmente (linksseitig gefüllte Symbole) wider: Zum einen verschiebt sich für alle Strahlenarten das Maximum mit zunehmender Dosis hin zu kleineren Fragmenten. Zum anderen nimmt die Steigung, welche eine Maß für die Interaktionen zwischen den DNA-DSBs zweier unabhängiger Teilchenbahnen ist, mit zunehmendem LET vom Betrag her zu. Das heißt, je höher der LET der Strahlenart ist, desto schneller verschiebt sich das Maximum des DNA-Gehaltes der Fragmentverteilungen zu kleineren Fragmenten hin. Der biologische Einfluss der Chromatinstruktur auf die Induzierung dsDNA-Fragmente ist im Verhalten der intra-Track-Fragmente (rechtsseitig gefüllte Symbole) erkennbar. Wie auch bei stationären MRC-5 Zellen ist sowohl bei exponentiell

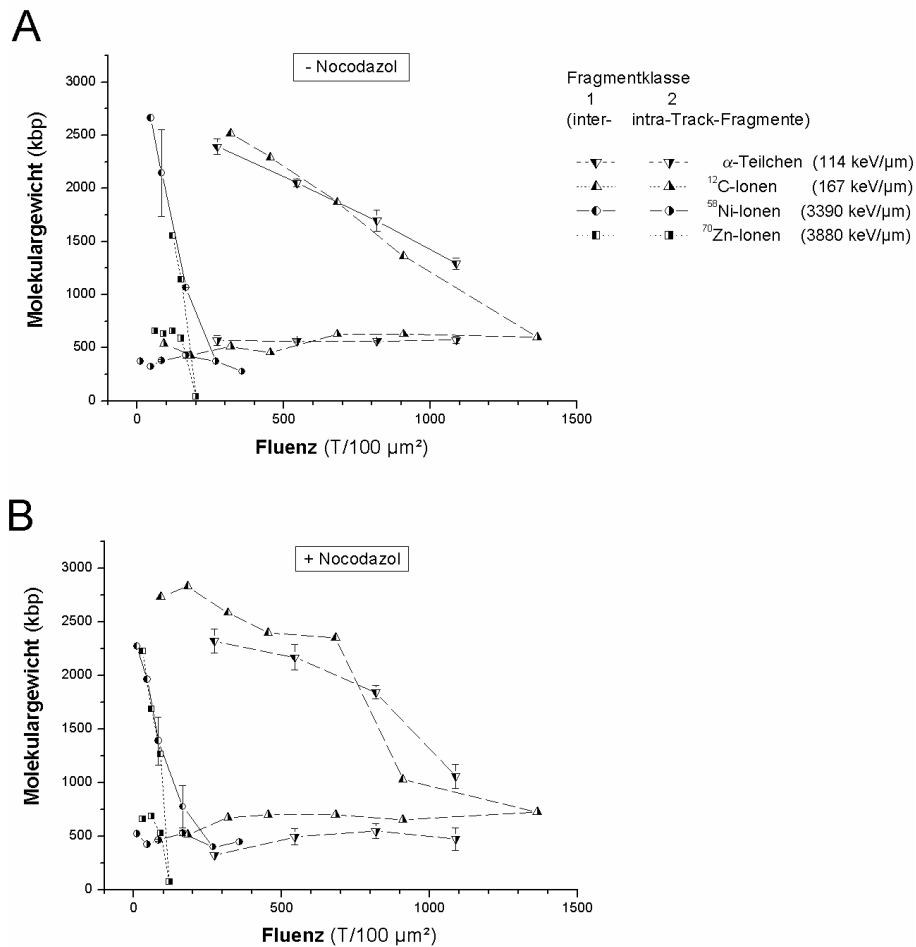


Abb. 3.15: Einfluss des LET und der Fluenz auf die Position der Maxima des DNA-Gehaltes generiert durch hoch-LET Bestrahlung in exponentiell wachsenden (A) und mitotisch angereicherten (B) MGH-U1 Zellen.

Die vorhandenen Fehlerbalken beruhen auf dem Standardfehler aus zwei unabhängigen Experimenten.

wachsenden, als auch bei mitotisch angereicherten MGH-U1 Kulturen nach Exposition der Zellen mit dicht ionisierender Strahlung ein maximaler DNA-Gehalt bei einem Molekulargewicht von 500 kbp detektierbar, welcher unabhängig von der Fluenz und vom LET ist.

Mit der quantitativen Analyse der durch verschiedene Strahlenarten generierten dsDNA-Fragmente in mitotisch angereicherten und exponentiell wachsenden Zellpopulationen wurde demonstriert, dass die Kondensation der Chromosomen über den Zellzyklus keinen Einfluss auf die Induktion von DNA-DSBs ausübt. Dies gilt sowohl für die Anzahl an induzierten DNA-DSBs, da die Werte der Induktionsraten in Abhängigkeit vom Zellzyklus sich nur unwesentlich voneinander unterscheiden, als auch für die Verteilung der DNA-DSBs innerhalb des Genoms, da eine gleiche Verteilung der Induktionsraten über alle Fragment-Größenbereiche vorherrscht.

Bei der qualitativen Betrachtung von Fragmenten, welche auf eine einzelne Teilchenspur zurückzuführen sind (intra-Track-Fragmente), zeigt sich, dass das mittlere Molekulargewicht dieser dsDNA-Fragmente auch in mitotisch angereicherten Zellen ca. 500 kbp ist. Dies ist ein Indiz dafür, dass die detektierte höher geordnete Chromatinstruktur von 500 kbp Länge keiner Variation über den Zellzyklus unterliegt. Vielmehr scheint die Kondensation der Chromosomen hauptsächlich von anderen strukturellen Komponenten abhängig zu sein.

3.3 Induktion von dsDNA-Fragmenten in verschiedenen Genomregionen

Während des Zellzyklus ändert sich der Kondensationsgrad der Chromosomen, die DNA unterliegt also einem globalen Wandel ihrer Konformation. Aber auch in ruhenden Zellen existieren mehrere verschiedene strukturelle Abschnitte. So hängt die Struktur des Chromatins unter anderem von der hauptsächlich Funktion der Chromosomenregion ab. Sichtbar ist dies zum Beispiel in der Chromosomenfärbung nach Giemsa. In dunklen Giemsa-Banden (Heterochromatin), welche AT reich sind, ist im Verhältnis zu hellen Giemsa-Banden (Euchromatin) die Gen-Dichte geringer. Aber auch Wiederholungen von spezifischen DNA-Sequenzen, wie im Zentromer oder im Telomer der Chromosomen, können die Struktur der DNA beeinflussen. So wird zwischen Regionen mit sehr vielen Wiederholungen, repetitive Regionen, und nicht-repetitiven Bereichen unterschieden.

Um herauszufinden, welche Einflüsse diese Variationen auf eine höher geordnete Chromatinorganisation besitzen, wurden die auf eine Nylonmembran übertragenen PFGE-Gele mit regionenspezifischen DNA-Sonden analysiert. Dabei konnten repetitive DNA-Bereiche mit heterochromatischem Charakter durch eine Zentromer-spezifische Sonde (D21Z1) und DNA-Bereiche mit euchromatischem Charakter durch eine Sonde zur Detektion ribosomaler DNA-Regionen (18s-rDNA) untersucht werden. Diese sind mit entsprechenden Ergebnissen aus „durchschnittlichen“ Genomregionen (D21S1) oder dem gesamten markierten Genom (genomische DNA) verglichen worden. In Abbildung 3.16 sind die nach einer Southern-Hybridisierung mit regionenspezifischen Sonden ausgelesenen Intensitätssignale nach der Bestrahlung mit ^{12}C -Ionen gezeigt. Es ist erkennbar, dass selbst eine Hybridisierung mit einer „single-copy“ Sonde (D21S1) ein gut verwertbares Signal ergibt.

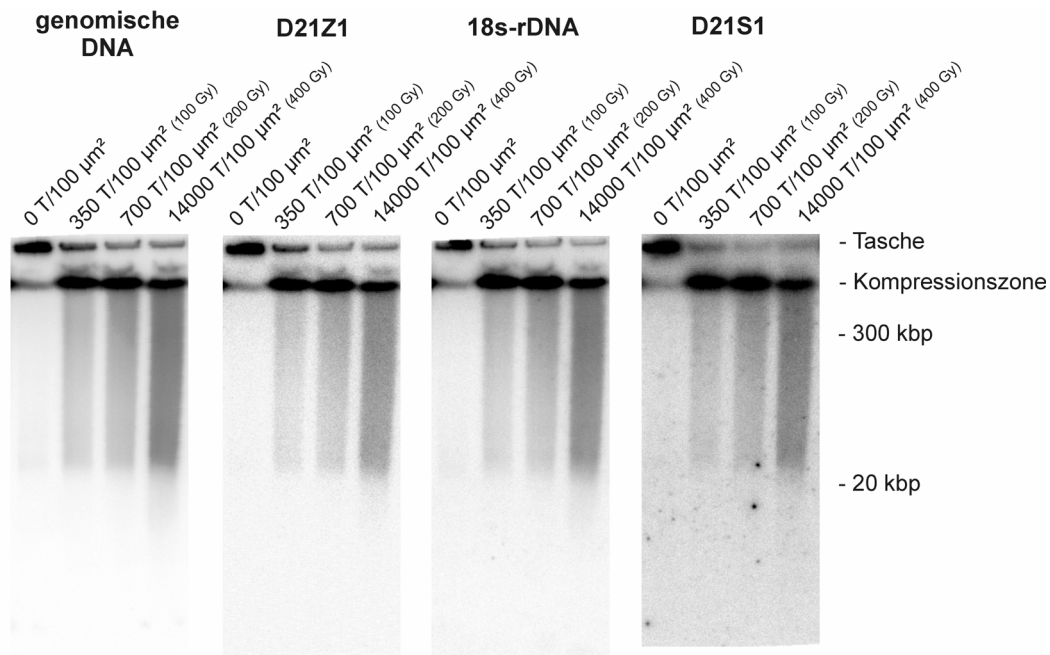


Abb. 3.16: Southern-Hybridisierung mit vier verschiedenen DNA-Sonden. Die Hybridisierungen wurden mit genomischer DNA, Zentromer-spezifischer DNA (D21Z1), ribosomaler DNA (18s-rDNA) und einer „single-copy“ Sonde (D21S1) durchgeführt. Zuvor wurden die mit ^{12}C -Ionen bestrahlten DNA-Proben mittels PFGE separiert und anschließend auf eine Nylon-Membran übertragen.

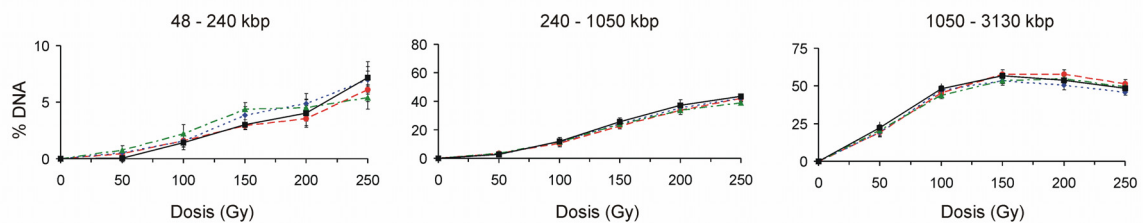
Eine quantitative Analyse der Induktion von dsDNA-Fragmenten ist in Abbildung 3.17 zu sehen, in der der DNA-Gehalt dreier verschiedener Fragment-Größenbereiche gegen die Dosis bzw. die Fluenz aufgetragen ist. Ein Bereich beinhaltet alle dsDNA-Fragmente von 1 bis 3 Mbp Länge. Innerhalb dieses Bereichs ist für jede gezeigte Strahlenart eine nahezu konstante Induktionsrate beobachtet worden (vergleiche Abb. 3.5). Zwei weitere Bereiche umfassen dsDNA-Fragmente unterhalb 1 Mbp. In diesen Bereichen werden durch dicht ionisierende Strahlung intra-Track-Fragmente induziert. Da die dsDNA-Fragmentverteilungen dieser Fragmentklasse einem Einfluss unterliegen, der auf die Chromatinstruktur zurückzuführen ist, wäre zu erwarten, dass eine strukturelle Änderung des Chromatins eine veränderte Fragmentverteilung nach sich zieht. Demnach sollte in den in Abbildung 3.17 dargestellten kleineren Fragment-Größenbereichen bei einer strukturellen intrachromosomalen Variation die größte Differenz zwischen den vier untersuchten Genomregionen zu erwarten sein.

Röntgenstrahlung wurde als Beispiel für eine dünn ionisierende Strahlenart verwendet. In Abbildung 3.17 ist zu sehen, dass innerhalb der betrachteten Größenbereiche die Induktionsraten nach Röntgenbestrahlung unabhängig von den untersuchten Genomregionen sind. Da Röntgenstrahlung in den hier untersuchten Bereichen nur wenige miteinander korrelierte DNA-DSBs erzeugt, entspricht dieses Ergebnis den vorhergesagten Erwartungen, wonach die Induktion von DNA-DSBs durch

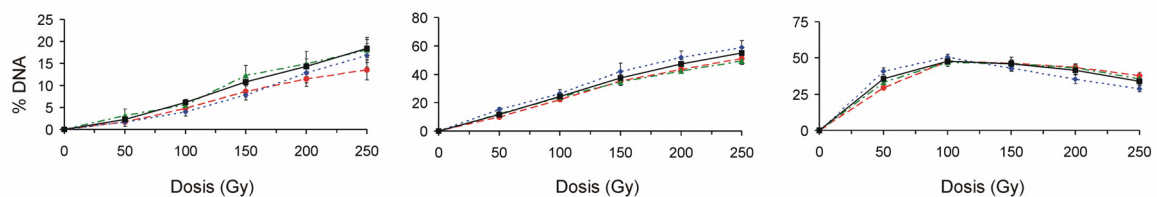
Röntgenstrahlung über das gesamte Genom stochastisch erfolgt. Nach Bestrahlung der Zellen mit α -Teilchen (3,6 MeV, 114 keV/ μm) konnte ebenfalls keine unterschiedliche Induktion von DNA-DSBs in Abhängigkeit von der Genomregion festgestellt werden. In allen drei Größenbereichen ändert sich der DNA-Gehalt von untersuchter Genomregion zu Genomregion nicht. Gleiches gilt für ^{12}C - (10 MeV/u, 167 keV/ μm) und ^{70}Zn -Ionen (5,6 MeV/u; 3880 keV/ μm).

Abbildung 3.18 zeigt beispielhaft für ausgewählte Fluenzen (67 T/100 μm^2 und 133 T/100 μm^2) die nach Bestrahlung mit Zink-Ionen erhaltenen DNA-Fragmentverteilungen, welche nach Southern-Hybridisierungen mit genomischer DNA (schwarz, siehe auch Abb. 3.2) und mit den Sonden D21Z1 (rot), 18s-rRNA (blau) sowie

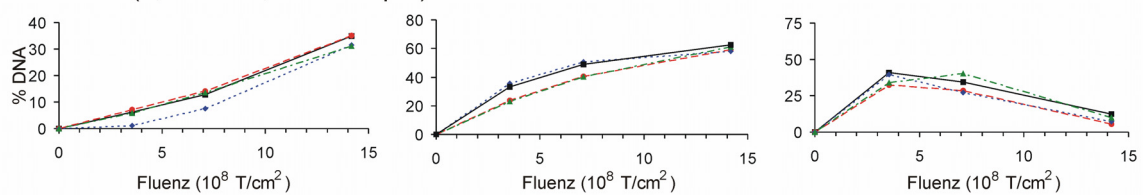
Röntgenstrahlung (95 keV)



α -Teilchen (0,92 MeV/u; 114 keV/ μm)



^{12}C -Ionen (9,9 MeV/u; 167 keV/ μm)



^{70}Zn -Ionen (5,6 MeV/u; 3880 keV/ μm)

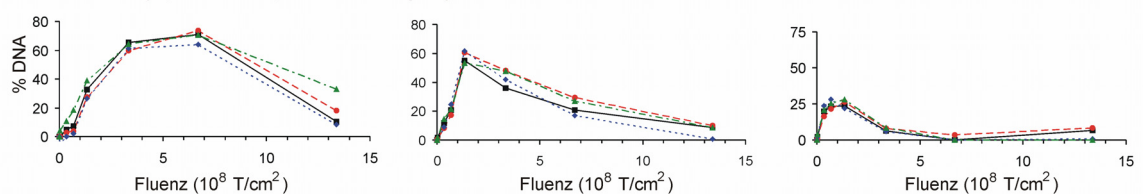


Abb. 3.17: Prozentualer Anteil der DNA-Masse als Funktion der Dosis in drei Fragment-Größenbereichen nach Exposition von MRC-5 Zellen mit Röntgenstrahlen, α -Teilchen, ^{12}C - und ^{70}Zn -Ionen.

Hybridisierungen wurden mit genomischer DNA (schwarz, durchgezogene Linie), Zentromer-spezifischer DNA (rot, gestrichelte Linie), ribosomaler DNA (blau, gepunktete Linie) und einer „single-copy“ Sonde (grün, Strich-Punkt-Linie) durchgeführt. Die dargestellten Fehlerbalken geben den Standardfehler aus 2 bis 4 unabhängigen Experimenten an.

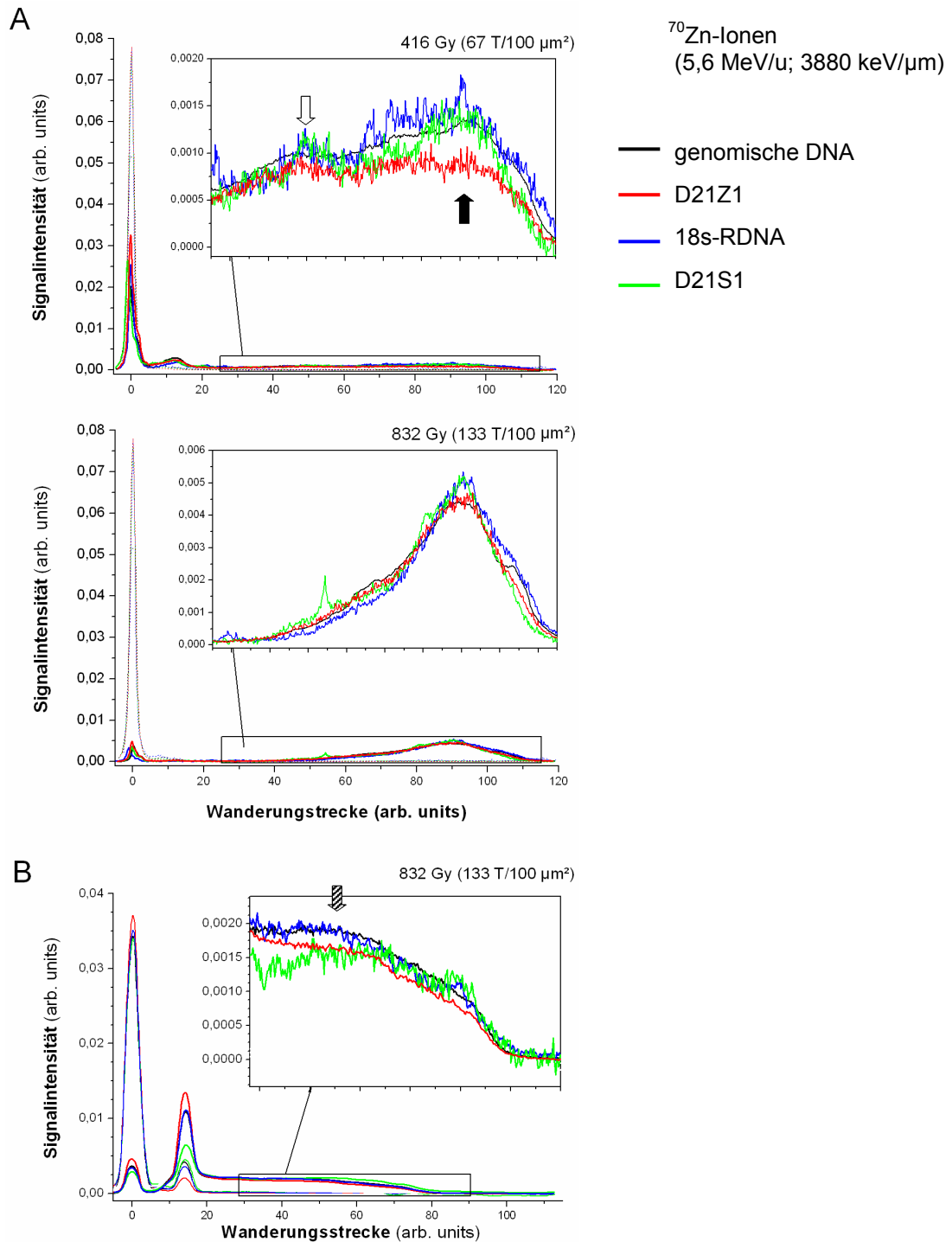


Abb. 3.18: DNA-Masseverteilungen nach Exposition primärer menschlicher Fibroblasten (MRC-85) mit ^{70}Zn -Ionen und Southern-Hybridisierung mit vier verschiedenen DNA-Sonden

(A) Fluenz von 67 T/100 μm^2 und Separationsbedingungen für Fragmente kleiner 3 Mbp. (B) Fluenz von 133 T/100 μm^2 und Separationsbedingungen für Fragmente kleiner 400 kbp. Die Hybridisierungen wurden mit genomischer DNA (schwarz), Zentromer-spezifischer DNA (rot), ribosomaler DNA (blau) und einer „single-copy“ Sonde (grün) durchgeführt. Die Kontrollen (gepunktete Linien) wurden zur besseren Übersicht in den Bildausschnitten nicht dargestellt.

Der offene Pfeil markiert das Maximum der inter-Track-Fragmente, der gefüllte Pfeil das Maximum der intra-Track-Fragmente und der schraffierte Pfeil zeigt die Überlagerung beider Fragmentarten. Die Daten wurden auf gleichen DNA-Gehalt normiert, der unspezifische Hintergrund der Hybridisierungen wurde abgezogen.

D21S1 (grün) gemessen wurden. Die zwei deutlich sichtbaren Maxima im linken Bildabschnitt zeigen den in den vorangegangenen Verteilungen nicht dargestellten DNA-Gehalt der Tasche (0 Längeneinheiten ins Gel gewandert) und der Kompressionszone (ca. 12 Längeneinheiten ins Gel gewandert). Zur besseren Veranschaulichung wurde der im Agarosegel aufgetrennte DNA-Bereich für diese Analyse hervorgehoben. In allen bisherigen Verteilungen dsDNA-Fragmente ist ausschließlich dieser Bereich dargestellt wurden. Bei der Betrachtung der Verteilungen ist sowohl in der Form, als auch in der Höhe der Signalintensität kein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Genomregionen erkennbar. In allen vier DNA-Bereichen sind inter- (Abb. 3.18A offener Pfeil) und intra-Track-Fragmente (Abb. 3.18A gefüllter Pfeil) erkennbar.

Die, nach Bestrahlung mit dicht ionisierenden Teilchen erhaltenen, nahezu identischen dsDNA-Fragmentverteilungen der unterschiedlichen Genomregionen deuten darauf hin, dass in allen untersuchten spezifischen Regionen nicht nur beide Fragmentarten generiert werden, sondern diese aufgrund der nahezu identischen Höhe der Signalintensitäten auch mit derselben Wahrscheinlichkeit auftreten. Gleiche Ergebnisse sind mit weiteren Fluenzen und anderen Strahlenarten erzielt worden. Dieses Ergebnis bedeuten, dass die tertiäre Chromatinstruktur nicht nur unabhängig von der Zellzyklusphase ist, sondern scheinbar auch von der Funktion der jeweiligen DNA-Regionen.

3.4 Reparatur von doppelsträngigen DNA-Fragmenten in unterschiedlichen Fragment-Größenbereichen

Zur Untersuchung der Reparatur dsDNA-Fragmente wurde das gleiche Verfahren wie auch zur Messung der Induktion dsDNA-Fragmente in verschiedenen Fragment-Größenbereichen angewendet. Nach der Bestrahlung der Proben wurden diese aufgearbeitet, anschließend konnte die DNA mittels einer PFGE separiert und durch eine Southern-Hybridisierung markiert werden. Anhand von Induktionspunkten wurden Dosis-Effekt-Kurven für jeden untersuchten Fragment-Größenbereich und jede Strahlenart erstellt (siehe Abb. 2.5). Diese dienten der nachfolgenden Ermittlung der Dosisäquivalente für jeden Reparaturpunkt, welche nach Division durch die Initialdosis den prozentualen Anteil unreparierter Brüche wiedergeben. Die Initialdosis ist diejenige Dosis mit welcher die Zellen bestrahlt wurden.

Es wurden die gleichen Fragment-Größenbereiche wie im vorangehenden Kapitel untersucht. Ein Bereich umfasst Fragmente zwischen 1 Mbp und 3 Mbp. Fragmente in diesem Größenbereiche werden größtenteils aus DNA-DSBs generiert, die von zwei unterschiedlichen Teilchenbahnen erzeugt werden. Demnach beschreiben die darauf beruhenden Reparaturkinetiken hauptsächlich das Reparaturverhalten von inter-Track-Fragmenten. Der kleinste Bereich, von 48 kbp bis 240 kbp, steht bei niedrigen Fluenzen für reine intra-Track-Fragmente. In diesem Bereich kann die Reparatur von DNA-DSBs einer Teilchenbahn, den miteinander korreliert erzeugten DNA-DSBs, untersucht werden. Da die Größe der induzierten intra-Track-Fragmente auch von den strukturellen Eigenschaften des Chromatins abhängt, ist in diesem Größenbereich nicht ausgeschlossen, dass die nachgewiesene höher geordnete Chromatinstruktur einen Einfluss auf die Reparatur dsDNA-Fragmente ausübt. Der mittlere Fragment-Größenbereich stellt letztendlich den Übergang zwischen beiden Fragmentarten dar, so dass die resultierenden Kinetiken eine Mischung der Reparatur von inter- und intra-Track-Fragmenten beschreiben. Die Untersuchung der DSB-Reparatur in Abhängigkeit vom Molekulargewicht der erzeugten dsDNA-Fragmente fand nach hoch-LET Bestrahlung mit zwei verschiedenen Dosen am UNILAC-Beschleuniger der GSI in Darmstadt statt. Die niedrige Initialdosis wurde so gewählt, dass im kleinsten untersuchten Fragment-Größenbereich hauptsächlich intra-Track-Fragmente generiert wurden. Nach Bestrahlung mit der hohen Initialdosis kam es hingegen im gleichen Fragment-Größenbereich zu einer Überlagerung von inter- und intra-Track-Fragmenten (vergleiche Abb. 3.2).

Für fünf Experimente mit unterschiedlichen Strahlenarten sind beispielhaft in Abbildung 3.19 die Induktionspunkte (schwarze Quadrate), welche den prozentualen DNA-Anteil im jeweiligen Fragment-Größenbereich bei der jeweiligen Dosis angeben, zu sehen. Auf diesen Induktionspunkten beruhen die mittels RBM gefitteten Dosis-Effekt-Kurven (gestrichelte Linien). Der prozentuale DNA-Gehalt in den untersuchten Größenbereichen nach verschiedenen Reparaturzeiten wird für den Fall der bei der Initialdosis noch unterscheidbaren inter- und intra-Track Fragmente (niedrige Dosis) rot und für den Fall der Überlagerung beider Fragmentklassen (hohe Dosis) grün wiedergegeben. Diese Reparaturpunkte wurden zur besseren Veranschaulichung direkt auf die Dosis-Effekt-Kurven aufgetragen. Somit können die Dosisäquivalente problemlos abgelesen werden. Bei Reparaturwerten, in denen keine eindeutige Zuordnung möglich ist, wie z.B. im Fragment-Größenbereich von 1050 kbp bis 3130 kbp dem 4 h Reparaturpunkt nach Bestrahlung mit ^{52}Cr -Ionen, konnte zumeist durch einen einfachen Vergleich der dsDNA-

Röntgenstrahlung (95 keV)

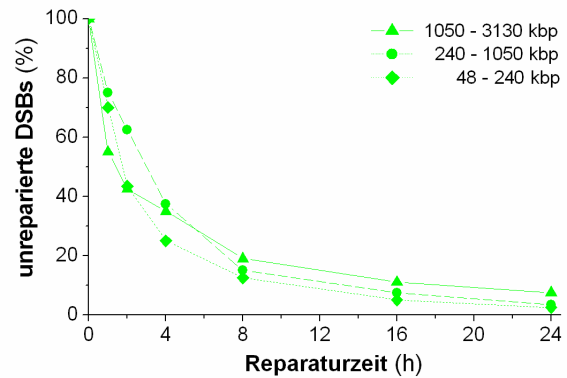
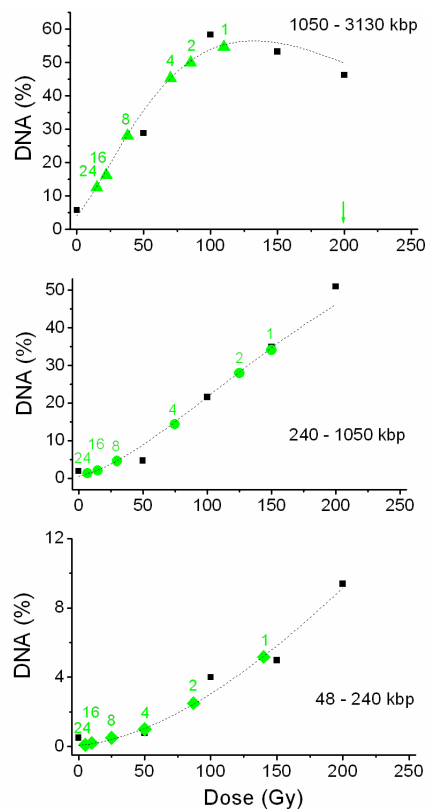
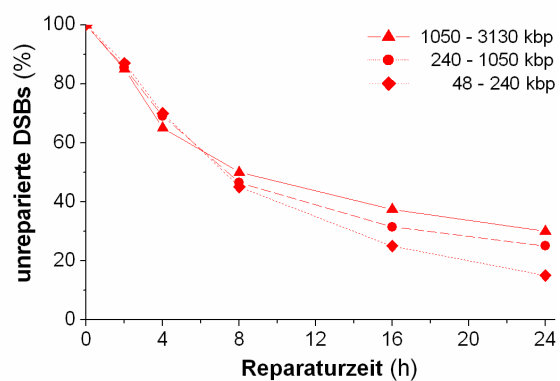
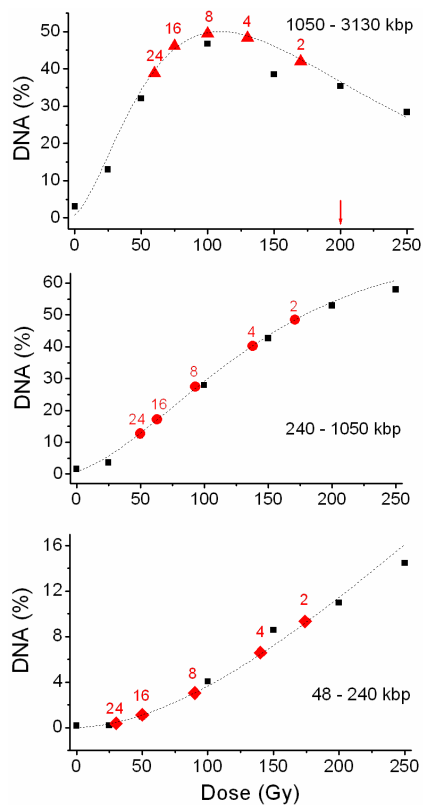
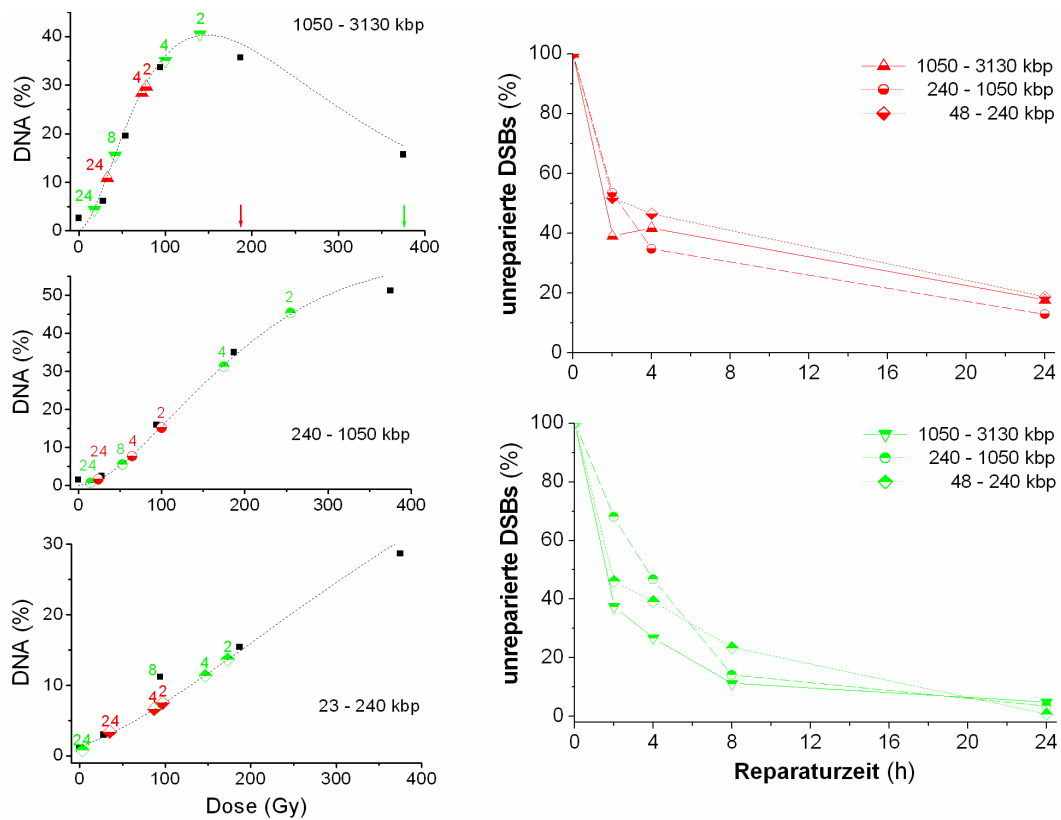
 α -Teilchen (0,92 MeV/u; 114 keV/ μ m)

Abb. 3.19a: Dosis-Effekt-Kurven und Reparaturkinetiken für verschiedene Fragment-Größenbereiche nach Bestrahlung konfluenter MRC-5 Zellen mit Röntgenstrahlung und α -Teilchen. Erklärung siehe unter 3.19c.

^{12}C -Ionen (9,9 MeV/u; 167 keV/ μm)



^{52}Cr -Ionen (6,5 MeV/u; 2630 keV/ μm)

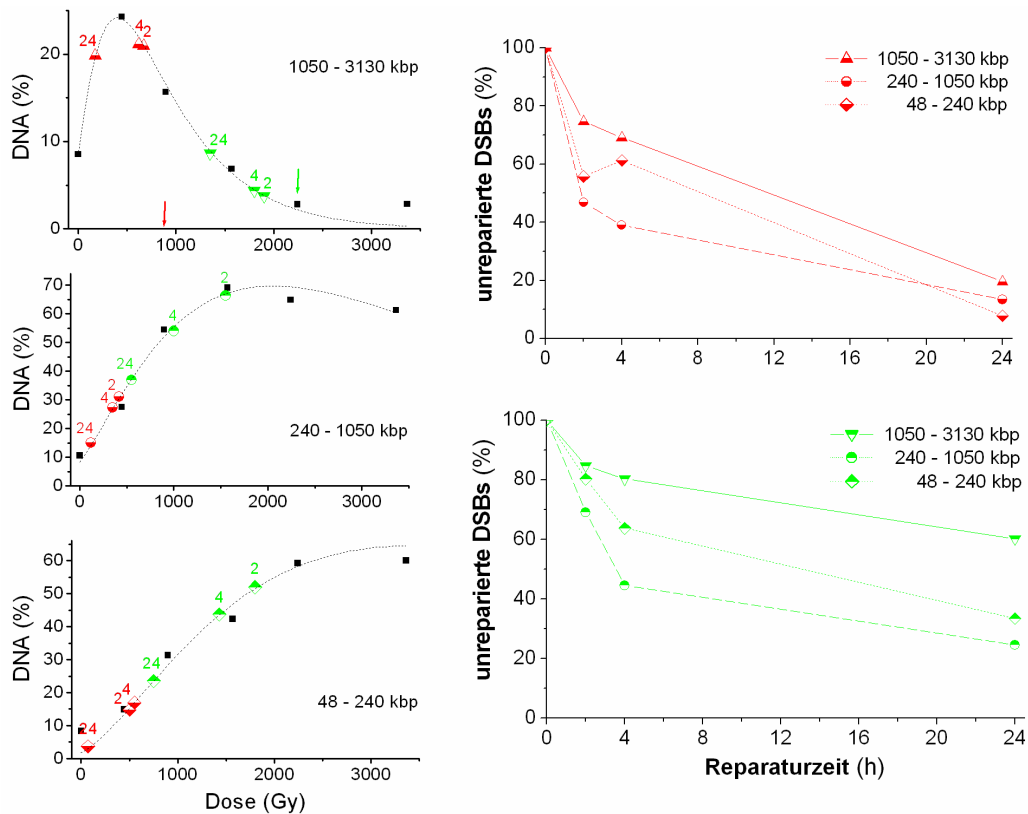


Abb. 3.19b: Dosis-Effekt-Kurven und Reparaturkinetiken für verschiedene Fragment-Größenbereiche nach Bestrahlung konfluenter MRC-5 Zellen mit Kohlenstoff-Ionen und Chrom-Ionen. Erklärung siehe unter 3.19c.

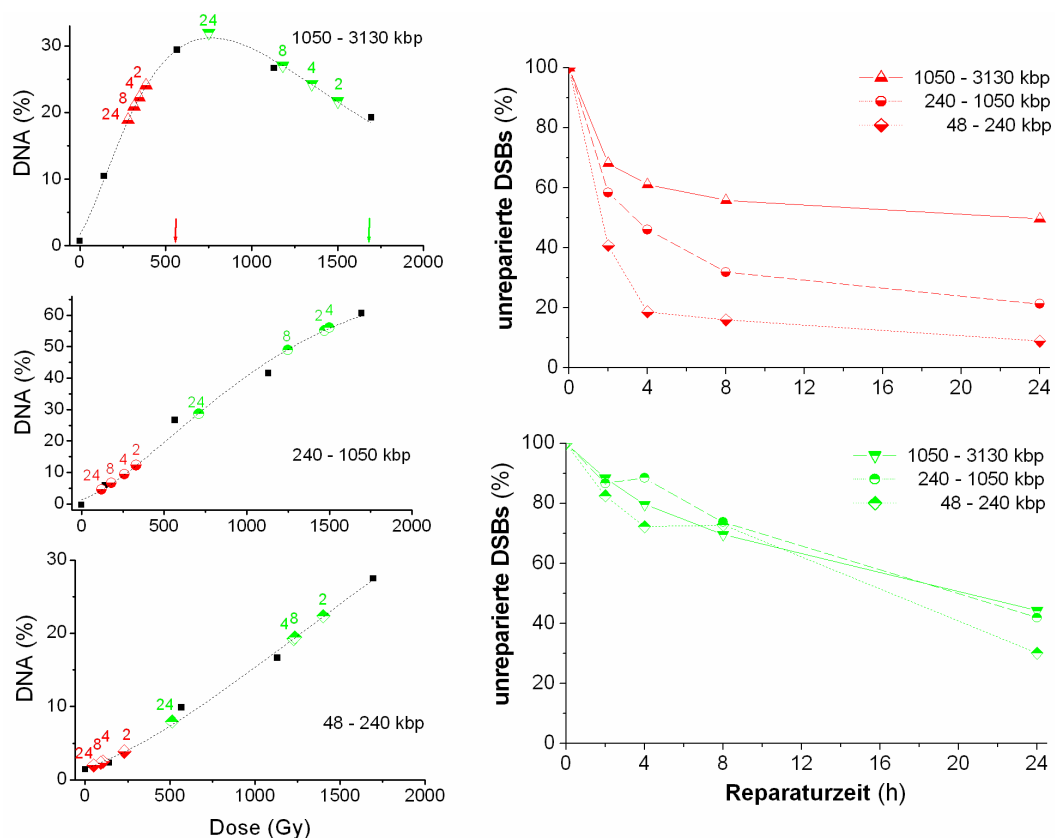
¹³²Xe-Ionen (4,4 MeV/u; 8816 keV/μm)

Abb. 3.19c: Dosis-Effekt-Kurven und Reparaturkinetiken für verschiedene Fragment-Größenbereiche nach Bestrahlung konfluenter MRC-5 Zellen mit Xenon-Ionen.

Links: Die kleinen schwarzen Quadrate zeigen den DNA-Gehalt in den Fragment-Größenbereichen bei entsprechender Dosis an. Auf diesen Daten beruhen die mittels RBM gefitteten Dosis-Effekt-Kurven (gestrichelte Linien). Der prozentuale DNA-Gehalt der Reparaturpunkte (farbig) wurde zur besseren Übersicht direkt auf die Dosis-Effekt-Kurven des jeweiligen Größenbereichs gelegt und mit ihren entsprechenden Reparaturzeiten (in h) vermerkt. Die Pfeile markieren die Initialdosen der Reparatur nach Bestrahlung mit verschiedenen Strahlenarten.

Rechts: Reparaturkinetiken aller drei Größenbereiche welche anhand der aus der linken Seite bestimmbaren Dosisäquivalente zum jeweiligen Reparaturzeitpunkt ermittelt wurden.

Die Farben sollen den Zustand der Trennbarkeit von inter- und intra-Track-Fragmenten durch die PFGE direkt nach der Bestrahlung verdeutlichen. Eine hohe Initialdosis führt zu einer Überlagerung beider Fragmentklassen, im Fall von Röntgenstrahlung werden jedoch nur „inter-Track-Fragmente“ generiert (grün). Bei der niedrigeren Initialdosis können beide Fragmentklassen noch getrennt separiert werden (rot).

Fragmentverteilungen (über alle Größenbereiche) mit den Verteilungen zeitlich benachbarten Reparaturpunkte entschieden werden, welcher der zwei möglichen Werte zutreffender ist. Eine andere Möglichkeit um den Reparaturpunkten ihr exaktes Dosisäquivalent zuzuordnen, bestand darin Dosis-Effekt-Kurven zu berechnen, die auf einem einfachen FAR-Assay beruhen. Dieser beruht auf der Ermittlung der Summe des DNA-Gehaltes aller generierten Fragmente unterhalb einer bestimmten Ausschlussgröße. Dadurch werden Dosis-Effekt-Kurven generiert, in denen jedem DNA-Gehalt (ab der gewählten Ausschlussgröße) nur genau eine Dosis zugeordnet werden kann (vergleiche Abb. 2.5). Der Nachteil dieses einfachen FAR-Assays besteht darin,

dass jeweils die Summe aller Fragmente unter der Ausschlussgröße gemessen wird. Das heißt, es erfolgt bei der reinen Untersuchung der Reparatur großer dsDNA-Fragmente eine Verfälschung durch kleinere Fragmente. Allerdings kann durch diesen Assay eine Zuordnung getroffen werden, welche Dosisäquivalente der gemessenen DNA-Gehalte der Reparaturpunkte in Abbildung 3.19 zutreffender sind. Nach Teilung der Dosisäquivalente durch die Initialdosis und Auftragung gegen die Reparaturzeit ergeben sich die auf der rechten Seite dargestellten Reparaturkinetiken.

Bei Experimenten mit Röntgenstrahlung (200 Gy Initialdosis) und α -Teilchen (Initialdosis = 200 Gy \cong 1088 Teilchen/100 μm^2 ; LET = 114 keV/ μm) wurde nur eine Dosis verwendet, da in einer Vielzahl an Veröffentlichungen die Reparatur mit niedrigeren Dosen bzw. mit Teilchen des gleichen LET bereits beschrieben ist. In an der GSI in Darmstadt durchgeführten Bestrahlungsexperimenten wurde die Reparatur von DNA-DSBs nach Bestrahlung mit zwei verschiedenen Initialdosen betrachtet. Dies gestattet es eine mögliche Abhängigkeit der Reparatur von der applizierten Dosis zu untersuchen. Bei einem Vergleich der Reparaturkinetiken nach Bestrahlung mit zwei unterschiedlichen Dosen ^{12}C -Ionen (187 Gy \cong 700 T/100 μm^2 bzw. 375 Gy \cong 1400 T/100 μm^2 ; 167 keV/ μm) wurde innerhalb des Fehlers kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Reparaturkinetiken gefunden (vergleiche auch Abb. 3.20). Bei höherem LET scheint die Reparatur jedoch von der Dosis abhängig zu sein. So zeigen sowohl Chrom- (842 Gy \cong 200 T/100 μm^2 bzw. 2106 Gy \cong 500 T/100 μm^2 ; 2630 keV/ μm) als auch Bestrahlungen mit Xenon-Ionen (565 Gy \cong 40 T/100 μm^2 bzw. 1695 Gy \cong 120 T/100 μm^2 ; 8816 keV/ μm) bei höherer Dosis eine langsamere Reparatur als bei niedrigerer Dosis. Insbesondere fällt dies beim Vergleich der kleinsten Fragmente auf. Weiterhin scheint die Reparatur von Fragmenten zwischen 48 kbp und 240 kbp Länge, also von Fragmenten, die innerhalb einer Teilchenbahn entstehen, schneller abzulaufen als bei inter-Track-Fragmenten. Dies ist nicht nur bei Teilchen mit hohem LET, wie Chrom- und Xenon-Ionen zu sehen. Selbst α -Teilchen und Kohlenstoff-Ionen (vergleiche Abb. 3.20) haben bei einer Fluenz, bei der sich inter- und intra-Track Fragmente noch nicht überlagern, 24 h nach Bestrahlung den größten Anteil unreparierter DNA-DSBs im Fragmentbereich zwischen 1 Mbp und 3 Mbp.

Um die Abhängigkeit der Reparatur von der Dosis bzw. der Fluenz und vom LET genauer betrachten zu können, sind in Abbildung 3.20 die Reparaturkinetiken unterschiedlicher Strahlenarten für die niedrigen (Abb. 3.20A) und die hohen (Abb. 3.20B) Initialdosen für alle drei Fragmentbereiche gegeneinander aufgetragen. Die Fehlerbalken stellen den jeweiligen Standardfehler von vier Röntgen-, drei α -Teilchen-

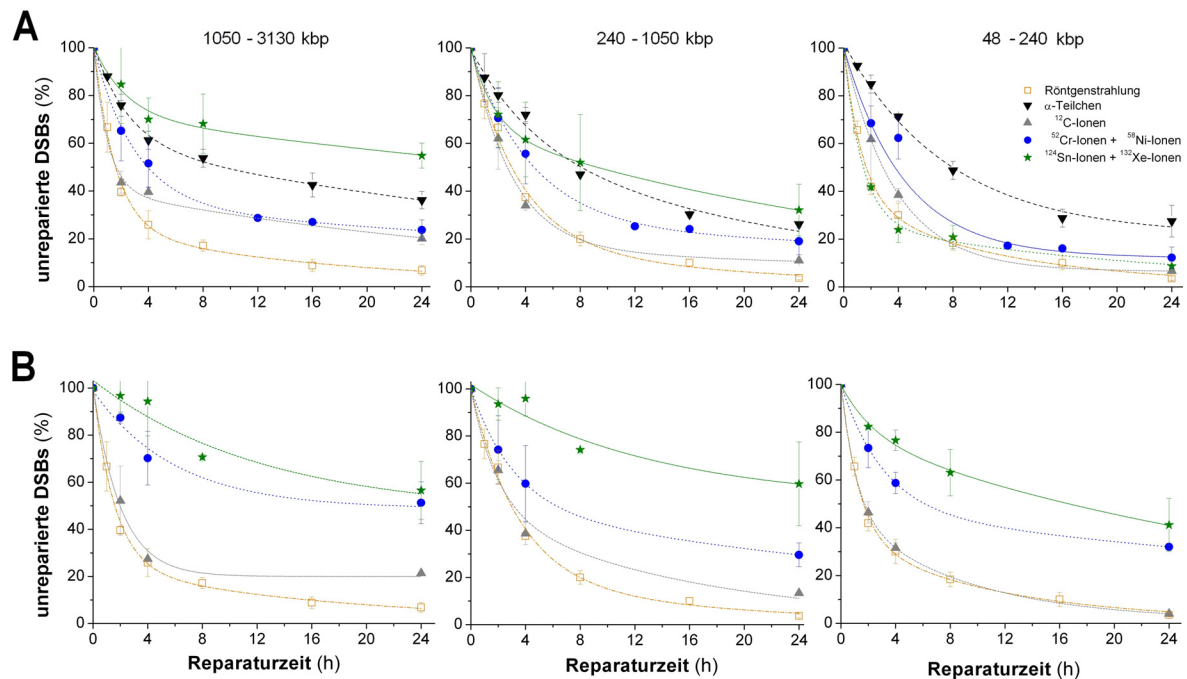


Abb. 3.20: DSB-Reparaturkinetiken in Abhängigkeit des LET und der generierten Fragmentklasse. Niedrige Initialdosen (A) führen zu unterschiedlichen Verhältnissen von inter- zu intra-Track-Fragmenten in den dargestellten Größenbereichen. Links ist die Reparatur hauptsächlich von inter-Track-Fragmenten, in der Mitte von einer Mischung beider Fragmentklassen und rechts hauptsächlich von intra-Track-Fragmente gezeigt. Eine hohe Initialdosis (B) führt zu einer Verdrängung von intra-Track-Fragmenten, daher gleicht die Reparaturkinetik selbst im kleinsten Fragmentbereich (rechts) den Kinetiken der inter-Track-Fragmente (links). Die Fehlerbalken dargestellten beruhen auf dem Standardfehler aus 2 bis 4 unabhängigen Experimenten.

oder zwei Kohlenstoff-Experimente dar. Aufgrund vergleichbarer Fluenzen und eines ähnlichen LET wurden zwei Experimente mit ^{52}Cr -Ionen ($842 \text{ Gy} \cong 200 \text{ T}/100 \mu\text{m}^2$ bzw. $2106 \text{ Gy} \cong 500 \text{ T}/100 \mu\text{m}^2$; $6,5 \text{ MeV/u}$; $2630 \text{ keV}/\mu\text{m}$) mit einem Experiment mit ^{58}Ni -Ionen ($869 \text{ Gy} \cong 160 \text{ T}/100 \mu\text{m}^2$ bzw. $2715 \text{ Gy} \cong 500 \text{ T}/100 \mu\text{m}^2$; $6,2 \text{ MeV/u}$; $3390 \text{ keV}/\mu\text{m}$) sowie jeweils ein Experiment mit ^{132}Xe -Ionen ($565 \text{ Gy} \cong 40 \text{ T}/100 \mu\text{m}^2$ bzw. $1695 \text{ Gy} \cong 120 \text{ T}/100 \mu\text{m}^2$; $4,4 \text{ MeV/u}$; $8816 \text{ keV}/\mu\text{m}$) und mit ^{124}Sn -Ionen ($583 \text{ Gy} \cong 46 \text{ T}/100 \mu\text{m}^2$ bzw. $1753 \text{ Gy} \cong 137 \text{ T}/100 \mu\text{m}^2$; $4,2 \text{ MeV/u}$; $8000 \text{ keV}/\mu\text{m}$) gemittelt. Zur besseren optischen Übersicht wurde an die Reparaturpunkte eine Kurve angelegt.

Bei Betrachtung der niedrigen Initialdosis ist folgendes ersichtlich: dsDNA-Fragmente im Größenbereich von 48 kbp bis 240 kbp (intra-Track-Fragmente) werden sehr schnell und nahezu unabhängig vom LET der Strahlenart repariert. Mit Zunahme des Anteils von inter-Track-Fragmenten, über eine Mischung beider Fragmentklassen im Größenbereich zwischen 240 kbp und 1050 kbp bis hin zu „reinen“ inter-Track-Fragmenten im Bereich von $1\text{-}3 \text{ Mbp}$, wird die Reparatur zunehmend langsamer und LET-abhängiger. So sind 24 h nach Bestrahlung mit ^{132}Xe -Ionen nur ca. 40% der Fragmente zwischen 1 Mbp und 3 Mbp repariert, wohingegen trotz höherer Dosis und höherer Fluenz etwa 75% der

induzierten DNA-DSBs nach Bestrahlung mit ^{52}Cr -Ionen repariert wurden (Abb. 3.20). Bei hohen Initialdosen ist eine ähnliche Abhängigkeit der Reparatur vom LET der Strahlung in allen Größenbereichen erkennbar. So werden DNA-DSBs nach Bestrahlung mit Ionen mit hohem LET deutlich langsamer repariert als nach Bestrahlung mit Ionen mit niedrigerem LET. Ein Grund für die Abhängigkeit der Reparatur vom LET der Strahlung in allen drei untersuchten Größenbereichen nach Bestrahlung mit hohen Dosen könnte darin liegen, dass bei hohen Dosen in allen Größenbereichen inter-Track-Fragmente generiert werden. Nach Bestrahlung mit niedrigeren Dosen treten diese inter-Track-Fragmente hingegen zunächst hauptsächlich nur im Fragment-Größenbereich von 1-3 Mbp auf.

Ein weiterer Punkt, der in Abbildung 3.20 ersichtlich ist, bezieht sich auf die Reparaturkinetiken von α -Teilchen. Diese zeigen trotz niedriger Initialdosis keine Abhängigkeit der Reparatur dsDNA-Fragmente von den untersuchten Fragment-Größenbereichen. Sie zeigen das gleiche Verhalten wie es nach Bestrahlung mit hohen Initialdosen der anderen Teilchenstrahlungen zu beobachten ist. Auch ist erkennbar, dass die Reparaturkinetiken nach Bestrahlung mit α -Teilchen nicht mit der LET-Abhängigkeit der Reparatur der anderen Strahlenarten korreliert. Die Ursache für diese Abweichung könnte in der Art der Bestrahlung selbst liegen. So fanden Experimente mit α -Teilchen alle in Homburg mit einer unkollierten Strahlenquelle statt. Wohingegen sämtliche dargestellten restlichen Experimente in Darmstadt an der GSI unter einem gerichteten (kollierten) Ionenfluss durchgeführt wurden. Auch kann nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass die für α -Bestrahlungen notwendigen veränderten Versuchsbedingungen, wie z.B. das Wachstum und die Haftung der Zellen auf Mylarfolie statt auf dem Boden von Petrischalen, einen Einfluss auf die DSB-Reparatur und die Ernte der bestrahlten Zellen ausüben.

3.5 Induktion und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen im Niedrigdosis-Bereich

Die Untersuchung der Wirkung von ionisierender Strahlung nach Dosen von wenigen mGy ist von besonderer Bedeutung, da diese im Bereich der natürlichen Strahlenbelastungen oder der diagnostischen und beruflichen Strahlenexpositionen liegen. Um die Induktion und Reparatur von DNA-DSBs bei entsprechend niedrigen

Dosen zu messen, wurde die Phosphorylierung von H2AX und die Dephosphorylierung von γ -H2AX in stationären primären menschlichen Fibroblasten (MRC-5) fluoreszenzmikroskopisch beobachtet. Gemessen wurden γ -H2AX Foci nach Bestrahlung der Zellen mit Röntgenstrahlung und mit α -Teilchen eines $^{241}\text{Americium}$ -Flächenstrahlers. Die α -Bestrahlungen wurden kollimiert (siehe Abb. 2.2) und unkollimiert durchgeführt.

Mittels der angewandeten γ -H2AX Methode können DNA-DSBs direkt nachgewiesen werden. So kann die Induktion und die Reparatur von DNA-DSBs selbst dann untersucht werden, wenn nur in einem Bruchteil der bestrahlten Zellen ein DNA-DSB induziert wurde. Allerdings ermöglicht es diese Methode nicht in der Umgebung von ca. 1 Mbp eines Bruches weitere DNA-DSBs zu identifizieren, da innerhalb dieser Distanz um den Bruch eine Phosphorylierung des Histons H2AX stattfindet (Rogakou *et al.* 1998).

3.5.1 Erwartete und mittlere Trefferzahl

Bei der Betrachtung der Induktion und Reparatur von DNA-DSBs nach Niedrigdosis-Bestrahlungen kommen die unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften der verschiedenen Strahlungen auf unterschiedliche Weisen zum Tragen. Zum einen unterscheiden sich locker und dicht ionisierende Strahlungen in der Verteilung der deponierten Energie innerhalb eines Zellkerns. Zum anderen führen die unterschiedlichen Strahlungen zu einer unterschiedlichen Verteilung der induzierten Schäden über die bestrahlten Zellpopulationen. So führt eine 50 mGy Bestrahlung durch die locker ionisierende Röntgenstrahlung zu einer homogenen Verteilung der Ionisationsereignisse, das heißt jede Zelle wird dementsprechend auch mit 50 mGy bestrahlt. Im Falle der in dieser Arbeit genutzten α -Strahlung erleiden bei gleicher Dosis jedoch nur vier von zehn Zellen messbare Strahlenschäden in Form von DNA-DSBs, welche durch eine γ -H2AX Fluoreszenzfärbung direkt quantifizierbar sind.

Die Ursache hierfür liegt in einer stochastischen Verteilung der Ionisationsspuren (Teilchenbahnen) über die bestrahlte Fläche. Diese Verteilung wird durch die Poisson-Statistik beschrieben. Diese besagt, dass bei einer mittleren Trefferzahl von einem Teilchen pro Zellkern 63% der Population mindestens einen direkten Strahlenschaden erleiden. Die restlichen 37% der Zellpopulation sind von keinem direkten Strahlenschaden betroffen. Bei hinreichend hoher Fluenz bzw. Dosis verliert sich dieser

stochastische Effekt, so dass von einer homogenen Energiedeponierung innerhalb der Population ausgegangen werden kann.

In Tabelle 3.3 sind die experimentell ermittelten prozentualen Anteile der direkt geschädigten Zellen nach α -Teilchen Niedrigdosis-Bestrahlungen aufgelistet. Diesen gegenüber stehen die kalkulierten Werte, welche über die Poisson-Verteilung berechnet worden sind (Gl. 2.5).

Die kalkulierten Werte ergaben sich aus der Berechnung des Anteils der Zellen, in welchen durch die Strahlung mindestens ein DNA-DSB induziert wurde. Dieser beträgt zum Beispiel bei einer mittleren Trefferzahl (Fluenz) von 0,078 Teilchen pro Zellkern 7,5%. Da in unbestrahlten Kontrollen ebenfalls γ -H2AX Foci messbar sind, muss dieser bereits geschädigte Zellanteil berücksichtigt werden. Das heißt, im Beispiel entfallen 0,9% ($7,5\% \cdot 0,122$) der induzierten γ -H2AX Foci auf Zellen, welche bereits mindestens einen DNA-DSB besaßen. Demnach wird zusätzlich zu Zellen, welche bereits vor der Bestrahlung mindestens einen DNA-DSB besaßen, in ca. 6,6 weiteren von 100 Zellen mindestens ein DNA-DSB induziert. Daraus ergibt sich der kalkulierte Wert von 18,8% bei einer mittleren Trefferzahl von 0,078 Teilchen pro Zellkern.

Prinzipiell unterscheiden sich die experimentellen und die kalkulierten Datensätze nicht voneinander. Die Ergebnisse zeigen zum einen, dass die Durchtritte der α -Teilchen durch die Zellkerne stochastisch verteilt über die Zellpopulation erfolgen. Dadurch wurde eine gleichmäßige Bestrahlung des zellulären Monolayers nachgewiesen. Zudem konnte

Tabelle 3.3: γ -H2AX Foci positive Zellen nach kollimierter und unkollimierter α -Teilchen-Bestrahlung.

Strahlenart	Fluenz (Teilchen/Zellkern ^c)	γ -H2AX Foci positive Zellen	
		(experimentell ermittelt) ^a (%)	(nach Poisson-Verteilung) (%)
α -Teilchen (kollimiert)	0	$12,2 \pm 1,3^b$	12,2
	0,078	$18,8 \pm 3,1^b$	18,8
	0,388	$26,3 \pm 2,2^b$	40,4
	2,387	$95,0 \pm 1,1^b$	91,9
α -Teilchen (unkollimiert)	0,388	$35,7 \pm 2,5^b$	40,4
	1,550	$85,6 \pm 6,4^b$	81,4

^a – Induktion nach 15 min gemessen.

^b – Standardfehler aus mindestens 3 Experimenten.

^c – Bei Annahme einer mittleren Zellkernfläche von $155 \mu\text{m}^2$.

die durch eine physikalische Dosimetrie bestimmte Fluenzrate experimentell bestätigt werden. Des Weiteren zeigt die Übereinstimmung beider Datensätze, dass innerhalb von 15 min keine zusätzlichen γ -H2AX Foci in Zellen entstehen, welche keinen Teilchendurchgang erfahren haben. Wären durch Bystander-Effekte in diesen „unbestrahlten“ Zellen DNA-DSBs induziert worden, hätten der Anteil der experimentell ermittelten Zellen mit mindestens einem Fokus über dem nach der Poisson-Verteilung berechneten Anteil liegen müssen.

3.5.2. H2AX Phosphorylierung – Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen

Die Induktion von DNA-DSBs nach Niedrigdosis-Bestrahlung ist durch den Nachweis der phosphorylierten Form des Histons H2AX untersucht worden. Hierbei wurde dicht ionisierende α -Strahlung und zum Vergleich dünn ionisierende Röntgenstrahlung verwendet. Röntgenstrahlung generiert über große Distanzen hinweg kaum korrelierte DNA-DSBs. Da jeder DNA-DSB ein einzelnes unabhängiges Ereignis darstellt, ist es möglich die Reparatur einzelner Brüche zu verfolgen (1 Fokus = 1 DNA-DSB). α -Teilchen induzieren entlang ihrer Bahn jedoch mehrere miteinander korrelierte DNA-DSBs. Daraus ergibt sich in Abhängigkeit vom betrachteten Winkel zur Teilchenbahn ein unterschiedliches Bild der Induktion und Reparatur der DNA-DSBs. Ein vertikal durchlaufendes Teilchen ergibt nur einen detektierbaren Fokus, welcher aber mehrere DNA-DSBs beinhalten kann. Ein horizontal durchlaufendes Teilchen kann mehrere sichtbare γ -H2AX Foci erzeugen, wobei jeder durch einen einzelnen DNA-DSB hervorgerufen worden sein kann. Bei einer unkollimierten Bestrahlung treten α -Teilchen sowohl senkrecht als auch schräg durch den Zellkern. Durch diese undefinierte Richtung der Teilchen können die gemessenen γ -H2AX Foci nicht exakt einem Teilchendurchgang bzw. einem DNA-DSB zugeordnet werden. Bei einer kollimierten Bestrahlung sind die physikalischen Strahlungsbedingungen besser definiert. Alle Teilchen treten nahezu senkrecht durch den Zellkern. Daher entspricht ein durch die kollimierte Strahlung induzierter sichtbarer Fokus exakt einem Teilchendurchgang. Dies ermöglicht es gleichzeitig die in der Dosimetrie ermittelte Fluenzrate am biologischen Objekt zu überprüfen.

Abbildung 3.21 zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Stapelaufnahme durch einen Teil von zwei Zellkernen, in denen schräg auftreffende α -Teilchen (einer unkollimierten Bestrahlung) mehrerer detektierbarer Foci hervorruft. Der Abstand zwischen den

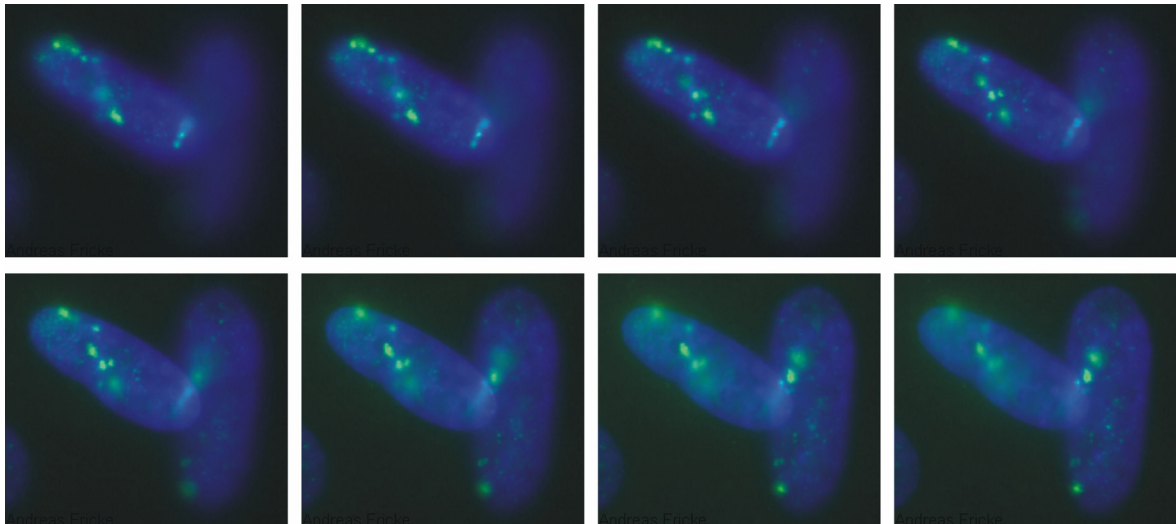


Abb. 3.21: γ -H2AX Fluoreszenzfärbung einer α -Teilchenbahn.

γ -H2AX Foci (grün) in MRC-5 Zellen, deren Kern durch DAPI angefärbt wurde (blau). Die Bilder stellen eine Stapelaufnahme durch den Zellkern dar mit 0,2 μ m Abstand zwischen jedem Schnitt.

aufeinander folgenden Schnittebenen beträgt 0,2 μ m. Deutlich erkennbar ist, dass mit zunehmender Eindringtiefe der α -Teilchen (Bilder von links oben nach rechts unten) mehrere Foci nacheinander erscheinen. Mit weiteren Schnitten durch den Zellkern, welcher 4 bis 6 μ m dick sein kann, verschwinden diese auch wieder. Die Reihenfolge des Auftauchens der γ -H2AX Foci in aufeinander folgenden Ebenen des Zellkerns, sowie die geradlinige Anordnung der Foci lassen auf einen gemeinsamen Ursprung der erzeugten DNA-DSBs schließen (auf ein einzelnes α -Teilchen). Bei einer unkollierten Bestrahlung darf jedoch die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass die Foci auch auf mehrere verschiedene α -Teilchen zurückführbar sein könnten. Allerdings hätten alle diese Teilchen senkrecht und geradlinig nebeneinander durch den Zellkern treten müssen. Dies ist wiederum sehr unwahrscheinlich. Des Weiteren wäre, aufgrund der Induzierung von DNA-DSBs nahezu entlang der gesamten Bahn der Teilchen, bereits mit dem Eindringen der Teilchen in den Zellkern mit dem ersten erkennbaren Foci zu rechnen. Das heißt, bei einem senkrechten Durchtritt aller Teilchen durch den Zellkern sollten alle Foci gleichzeitig in einer Schnittebene auftauchen. Da in Abbildung 3.21 die γ -H2AX Foci nacheinander in verschiedenen Schnittebenen erscheinen (und auch wieder verschwinden), deutet dies eher darauf hin, dass diese Zellkerne nicht von mehreren senkrechten Teilchen getroffen wurden, sondern von mindestens zwei quer durchlaufenden Teilchen.

In Abbildung 3.22 sind für verschiedene Strahlenqualitäten die am Fluoreszenzmikroskop gezählten γ -H2AX Foci gegen die Dosis aufgetragen. Nach Röntgenbestrahlung sind hauptsächlich einzelne DNA-DSBs für die Ausprägung eines Fokus

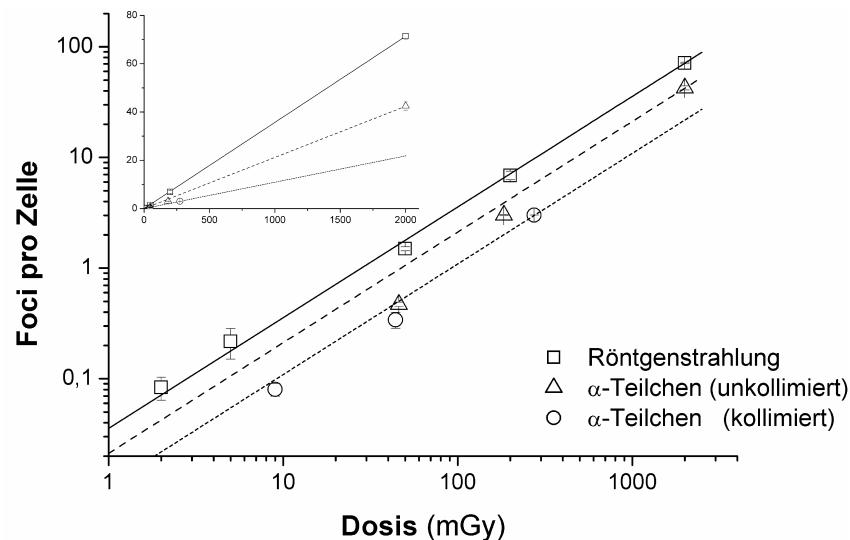


Abb. 3.22: Ausprägung von γ -H2AX Foci in Abhängigkeit von der Strahlenart.

Der Anstieg der Geraden entspricht den γ -H2AX Foci Induktionsraten in MRC-5 Zellen. Die Anzahl an γ -H2AX Foci der unbestrahlten Proben wurde in jedem Experiment separat berücksichtigt. Im Inset ist die gleiche Induktion nur mit linearen Achsenabschnitten nochmals aufgetragen, wodurch die unterschiedlichen Anstiege der Geraden besser sichtbar sind.

Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

verantwortlich. Es zeigt sich ein sehr guter linearer Zusammenhang zwischen der Dosis und der Induktion von γ -H2AX Foci. Nach einer kollimierten α -Teilchen Bestrahlung ist der Fokus auf eine ganze Teilchenbahn zurückzuführen, welche mehrere DNA-DSBs beinhalten kann. Auch bei dieser Strahlenqualität ist ein sehr guter linearer Zusammenhang zwischen der applizierten Dosis und der gemessenen Anzahl an Foci pro Zellkern gezeigt. Eine ähnliche lineare Beziehung ist ebenfalls für unkollimierte α -Teilchen Bestrahlungen beobachtbar. Allerdings stellen diese Foci nicht notwendigerweise einen einzelnen DNA-DSB oder eine einzelne Teilchenbahn dar. Die Induktionsraten dieser drei Strahlenqualitäten (in γ -H2AX Foci/Gy/Zelle) lassen sich durch Berechnung des Anstiegs der Geraden in Abbildung 3.22 ermitteln. In Tabelle 3.4 sind diese Induktionsraten zusammen mit den Induktionsraten ermittelt aus PFGE-Analysen (in DSBs/Gy/Zelle) aufgelistet.

Aus Tabelle 3.4 ist erkennbar, dass nach Röntgenbestrahlung trotz anscheinend gleicher Anzahl an detektierbaren DNA-DSBs sich die Induktionsraten von einer zur anderen Nachweismethode unterscheiden. Diese Diskrepanz kann unter anderem auf den Zeitpunkt der Messung der Induktionpunkte zurückgeführt werden. Mittels der PFGE-Technik können alle DNA-DSBs direkt im Anschluss an die Bestrahlung gemessen werden. Die Ausprägung von γ -H2AX Foci erfordert hingegen eine gewisse Zeitspanne. Deshalb erfolgte in der vorliegenden Arbeit die Fluoreszenzfärbung der

Tabelle 3.4: Benutzte Strahlenarten und ihre Merkmale.

Strahlenart	LET (keV/ μ m)	Methode	Induktionsrate \pm SE ^{a,c} (γ -H2AX Foci bzw. DSBs /Gy/Zelle)	Induktionsrate \pm SE ^{a,b,c} (γ -H2AX Foci bzw. DSBs /Teilchen/Zellkern)	detektierbare DNA-DSBs
Röntgenstrahlung (90 keV)		γ -H2AX ^d	35,7 \pm 0,6		einzelne DNA-DSBs
Röntgenstrahlung (95 keV)		PFGE ^e	47,0 \pm 2,8		einzelne DNA-DSBs
α -Teilchen (kollimiert)	111	γ -H2AX ^d	10,8 \pm 0,4	1,2 \pm 0,1	Teilchenbahnen
α -Teilchen (unkollimiert)	114	γ -H2AX ^d	21,2 \pm 0,4	2,5 \pm 0,1	Teilchenbahnen und einzelne DNA-DSBs
α -Teilchen (unkollimiert)	114	PFGE ^e	78,3 \pm 1,6	9,3 \pm 0,2	einzelne DNA-DSBs

^a – 6,2 Gbp pro diploider Zelle in der G₀/G₁-Phase.

^b – Bei Annahme einer mittleren Zellkernfläche von 155 μ m².

^c – Standardfehler der linearen Regression.

^d – Induktion nach 15 min gemessen (G₀/G₁-Phase des Zellzyklus).

^e – Induktion direkt nach 0 min gemessen, siehe auch Tabelle 3.1 (G₀/G₁-Phase des Zellzyklus).

Induktionpunkte erst nach einer 15minütigen Inkubation (37°C) der Zellen. Innerhalb dieser Zeitspanne können mehr als 30% der γ -H2AX Foci dephosphoryliert werden (Riballo *et al.* 2004). Zusätzlich können mittels der γ -H2AX Methode im Gegensatz zur PFGE Methode DNA-DSBs, welche sich in einer Entfernung von ca. 1 Mbp zur Bruchstelle befinden, nicht aufgelöst werden. Da Niedrigdosis-Röntgenbestrahlungen auf Deckgläschen stattfanden, wird der hier beobachtete Effekt der niedrigeren Induktionsrate in γ -H2AX Foci/Gy/Zelle gegen die Induktionsrate in DSBs/Gy/Zelle (PFGE) wahrscheinlich noch unterschätzt. So ist in Kegel *et al.* 2007 nach einer 120 keV Röntgenbestrahlung ein Anstieg der Induktionsrate von 20 Br/(Gy*Genom) bei Bestrahlung der Zellen auf Mylar-Folie auf 40 Br/(Gy*Genom) bei Bestrahlung der Zellen auf Deckgläschen beschrieben.

Der γ -H2AX Immunfluoreszenznachweis nach Bestrahlungen der Zellen mit α -Teilchen erfolgte ebenfalls nach einer 15minütigen Inkubation. Innerhalb dieser Zeitspanne ist bei einer kollimierten α -Teilchen Bestrahlung nicht mit einem Rückgang der Anzahl an messbaren Foci zu rechnen. Dies geschieht erst, wenn alle DNA-DSBs der gesamten Teilchenbahn repariert worden sind (siehe Abb. 3.23). Damit eine Energiedosis von 1 Gy im Zellkern einer MRC-5 Zelle deponiert wird (mittlere Zellkernfläche: 155 μ m²), müssen bei einer kollimierten Bestrahlung 8,7 α -Teilchen (3,7 MeV; 111,6 KeV/ μ m) diesen Kern durchqueren (Gl. 1.3). Daraus ergibt sich ein Verhältnis von 1,2 detektierbaren γ -H2AX Foci pro Teilchen. Dieses Verhältnis verdeutlicht, dass bei einer senkrecht gerichteten

Teilchenbestrahlung der Zellen nahezu jede Bahn für die Ausbildung exakt eines messbaren Fokus verantwortlich ist. Wird nach einer kollimierten Bestrahlung die Induzierung der gleichen Anzahl an DNA-DSBs wie bei einer unkollimierten Bestrahlung vorausgesetzt ($9,3 \text{ Br}/(\text{Teilchen} \cdot \text{Genom})$ bzw. $78,3 \text{ Br}/(\text{Gy} \cdot \text{Genom})$ aus PFGE Daten), dann beinhaltet ein einzelner γ -H2AX Fokus ca. 7,5 übereinander liegende DNA-DSBs.

Bei einer unkollimierten Bestrahlung (3,66 MeV; 114,7 keV/ μm) werden innerhalb der ersten 15 Minuten ca. 15% der γ -H2AX Foci wieder dephosphoryliert (Riballo *et al.* 2004). Daher sollten direkt nach der Bestrahlung von 1 Gray ($\hat{=}$ 8,4 Teilchen/Zellkern) etwa 25 Foci beobachtet werden können. Dies bedeutet wiederum, dass im Mittel ein α -Teilchen unter den gegebenen unkollimierten Bedingungen zu ca. drei detektierbaren Foci führt. Die Anzahl an DNA-DSBs innerhalb eines einzelnen Fokus kann dabei von einem bis über neun Brüche reichen.

3.5.2 γ -H2AX Dephosphorylierung – Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

In Kapitel 3.4 der vorliegenden Arbeit wurde die Reparatur von DNA-DSBs anhand der PFGE-Methode untersucht. Um mittels dieser Methode gut messbare Ergebnisse zu erhalten, ist eine Bestrahlung der Zellen mit unphysiologisch hohen Dosen unerlässlich. Mittels der γ -H2AX Methode ist jedoch ein Nachweis der Induktion und Reparatur von DNA-DSBs im Niedrigdosis-Bereich möglich. Ein Vergleich der Reparaturkinetiken beider Methoden miteinander kann eine eventuelle Abhängigkeit der Reparatur von der Dosis aufzeigen. Dadurch können Rückschlüsse auf die Reparatur von DNA-DSBs im Bereich der natürlichen Strahlenexposition gezogen werden.

Wie bereits beschrieben, beruhen γ -H2AX Foci in Abhängigkeit von der benutzten Strahlenqualität auf einer unterschiedlichen Anzahl an DNA-DSBs. Nach Röntgenbestrahlung stellt jeder Fokus einen einzelnen DNA-DSBs dar. Nach Bestrahlungen mit kollimierten α -Teilchen repräsentiert ein Fokus sämtlich DNA-DSBs einer ganzen Teilchenbahn, während bei einer unkollimierten Bestrahlung ein Fokus sowohl auf einen einzelnen DNA-DSB, wie auch auf eine ganze Teilchenbahn zurückführbar sein kann. Das heißt, das Verschwinden der γ -H2AX Foci (die DSB-Reparatur) muss auch unter den verschiedenen Bedeutungen der Foci in Abhängigkeit von der Strahlenqualität betrachtet werden.

In Abbildung 3.23 sind für die drei verwendeten Strahlenqualitäten die Kinetiken des Verschwindens der beobachtbaren γ -H2AX Foci nach unterschiedlichen Niedrigdosis-Bestrahlungen dargestellt. Jedem einzelnen Datenpunkt liegen mindestens zwei unabhängige Experimente zugrunde. Die schwarzen Säulen stellen den natürlich auftretenden Hintergrund an γ -H2AX Foci in den Zellen dar. Die weißen Säulen zeigen die über dem Hintergrund liegende Anzahl an induzierten γ -H2AX Foci.

γ -H2AX Foci Reparaturkinetiken nach Röntgenbestrahlungen zeigen eine Abhängigkeit der Reparatur von der applizierten Dosis. Bestrahlungen von MRC-5 Zellen mit Dosen von 50 mGy und 200 mGy führen dazu, dass eine deutliche Reparatur sichtbar ist. Dabei unterscheiden sich die Kinetiken nach diesen Dosen kaum von den DSB-Reparaturkinetiken, welche mittels der PFGE-Methode gemessen worden sind (siehe Abb. 3.20). So verbleiben nach 24 h Reparatur-Inkubation der Zellen ca. 8% (50 mGy) bzw. 3,5% (200 mGy) der induzierten γ -H2AX Foci. Der durch PFGE ermittelte Anteil unreparierter Brüche nach 24 h beträgt je nach untersuchtem Fragment-Größenbereich zwischen 3,5% und 6,8%. In Abbildung 3.23 ist bei der Berechnung zu beachten, dass jeweils der erste dargestellte Datenpunkt bereits eine 15 minütige Inkubation, in der ca. 30% der DNA-DSBs repariert werden, beinhaltet. Bei einer Dosis, bei der im Durchschnitt in jeder zehnten (2 mGy) bzw. in jeder vierten (5 mGy) Zelle ein DNA-DSB generiert wird, ist hingegen kein Verschwinden der γ -H2AX Foci beobachtbar. Dies ist mit Daten konsistent, die durch Rothkamm und Löbrich (Rothkamm und Löbrich 2003) veröffentlicht wurden. In der zitierten Arbeit konnte die Reparatur erst ab einer Dosis von mindestens 20 mGy Röntgenstrahlung nachgewiesen werden. Niedrigere Dosen führten zu einer Persistenz der induzierten γ -H2AX Foci über mehrere Tage. Ein Grund für die „Nicht-Reparatur“ nach niedrigen Dosen dünn ionisierender Strahlung kann ein noch zu geringer Stresspegel der Zellen sein. Dies deutet darauf hin, dass die Initiierung der Reparatur von DNA-DSBs von einer Schwellendosis abhängt. Ist dieser Schwellenwert jedoch einmal überschritten, scheint die Reparatur Dosis-unabhängig zu sein.

Bei einer kollimierten α -Teilchen Bestrahlung (3,7 MeV; 111,6 KeV/ μ m) wird die Gesamt-Reparatur aller in der Teilchenbahn vorhandenen DNA-DSBs untersucht. Um kein Immunfluoreszenzsignal mehr detektieren zu können, müssen alle Brüche innerhalb der Bahn repariert worden sein. Demnach sollte innerhalb der ersten Stunden nach kollimierter α -Teilchen Bestrahlung keine effektiv sichtbare Reparatur beobachtbar sein. Dieses erwartete Verhalten wird durch die in Abbildung 3.23 gezeigten Daten bestätigt. Erst nach ca. 4 - 8 h geht die Anzahl der gemessenen γ -H2AX Foci pro Zellkern deutlich zurück. Dabei verbleiben nach 24 h Reparatur-Inkubation 21% (9 mGy), 28% (44 mGy)

bzw. 27% (274 mGy) der induzierten Foci. Der Vergleich der Reparaturkinetiken der γ -H2AX Methode mit der PFGE-Methode zeigt, dass zu diesem Zeitpunkt im Fragment-Größenbereich der reinen intra-Track-Fragmente (48 – 240 kbp) ein nahezu identischer Anteil an unreparierten Brüchen verbleibt (28%; siehe Abb. 3.20). Dieser Bereich wurde deshalb gewählt, da bei den in Abbildung 3.23 benutzten niedrigen Fluenzen hauptsächlich nur intra-Track-Fragmente induziert werden. Da nach 24 h der Anteil an unreparierten Brüchen unabhängig von der Dosis ist, scheint die Reparatur von intra-Track-Fragmenten bzw. die Reparatur aller DNA-DSBs einer einzigen Teilchenbahn unabhängig von der Anzahl an Teilchen pro Zellkern zu sein. Zu späteren Reparaturzeiten nimmt die Anzahl an detektierbaren Foci pro Zelle weiter ab. Hierbei scheint bei einer Dosis von 9 mGy eine schnellere und vollständige Reparatur stattzufinden. Dieses Verhalten kann wahrscheinlich auf die Grenze der Auflösbarkeit von zusätzlichen γ -H2AX Foci (gegenüber dem Hintergrund) zurückgeführt werden. So beträgt der Anteil an unreparierten DNA-DSBs nach PFGE-Analysen nach 7 Tagen ca. 5% (Kühne *et al.* 2000). Wird dieser Wert auf eine Initialdosis von 9 mGy (0,08 T/Zellkern) übertragen, dann besitzen lediglich nur noch 4 von 1000 Zellkernen einen strahleninduzierten Fokus.

Zusätzlich ist nach einer kollimierten α -Teilchen Bestrahlung beobachtbar, dass die Reparatur von DNA-DSBs unabhängig von der Anzahl der geschädigten Zellen ist. So setzt die Reparatur sowohl bei einer Fluenz ein, bei der im Durchschnitt jede zweite Zelle (50 mGy) bzw. sogar nur jede zehnte Zelle (10 mGy) von einem α -Teilchen durchquert wird. Durchquert ein einziges α -Teilchen den Zellkern, deponiert es jedoch bereits eine Dosis von 114 mGy, was mehr als dem 5fachen der Dosis entspricht, die zu einer beobachtbaren Reparatur nach Röntgenbestrahlung führt.

Nach einer unkollimierten α -Teilchen Bestrahlung (3,66 MeV; 114,7 keV/ μ m) können die induzierten γ -H2AX Foci nicht exakt einem DNA-DSB bzw. einer Teilchenbahn zugeordnet werden. Daraus resultiert, dass das Verschwinden der einzelnen Foci ebenfalls nicht exakt der Reparatur einzelner DNA-DSBs bzw. der Reparatur ganzer Teilchenbahn zugeordnet werden kann. In Abbildung 3.23 ist gezeigt, dass bereits innerhalb der ersten Stunden eine beobachtbare Reparatur einsetzt. Diese scheinbar schnellere Reparatur ist wahrscheinlich auf Foci zurückführbar, die nur aus einem einzelnen DNA-DSB bestehen und somit beim Verbinden der Bruchenden, gefolgt von der Dephosphorylierung der γ -H2AX Histone sofort verschwinden. Diese „einzelnen“ Brüche können bei einer unkollimierten α -Bestrahlung durch ein schräg durch den Zellkern tretendes Teilchen induziert werden.

Wird bei einer unkollimierten Bestrahlung mit α -Teilchen vorausgesetzt, dass 15% der induzierten Foci innerhalb der ersten 15 min verschwinden, so verbleiben 24 h nach Bestrahlung 15% (46 mGy) bzw. 17% (184 mGy) der induzierten γ -H2AX Foci (Abb. 3.23). Nach einer 2 Gy Bestrahlung verbleiben zum gleichen Zeitpunkt ca. 18% der Foci (Riballo *et al.* 2004). Die Konstanz dieser Daten deutet darauf hin, dass, wie auch bei kollimierten α -Teilchen Bestrahlungen, die Reparatur der DNA-DSBs unabhängig von der applizierten Dosis ist. Die Abweichung der gezeigten Daten zu dem mittels der PFGE-Methode gemessenen Wert (28% verbleibende DNA-DSBs nach 24 h) könnte darauf zurückgeführt werden, dass komplexe Brüche, welche nahe beieinander liegen (Distanz < 2 Mbp), mittels der γ -H2AX Methode nur einen detektierbaren Fokus ergeben. Hingegen können einzelne komplexe DNA-DSBs durch eine PFGE-Analyse selbst dann detektiert werden, wenn sie sich in einer Distanz von wenigen kbp zueinander befinden.

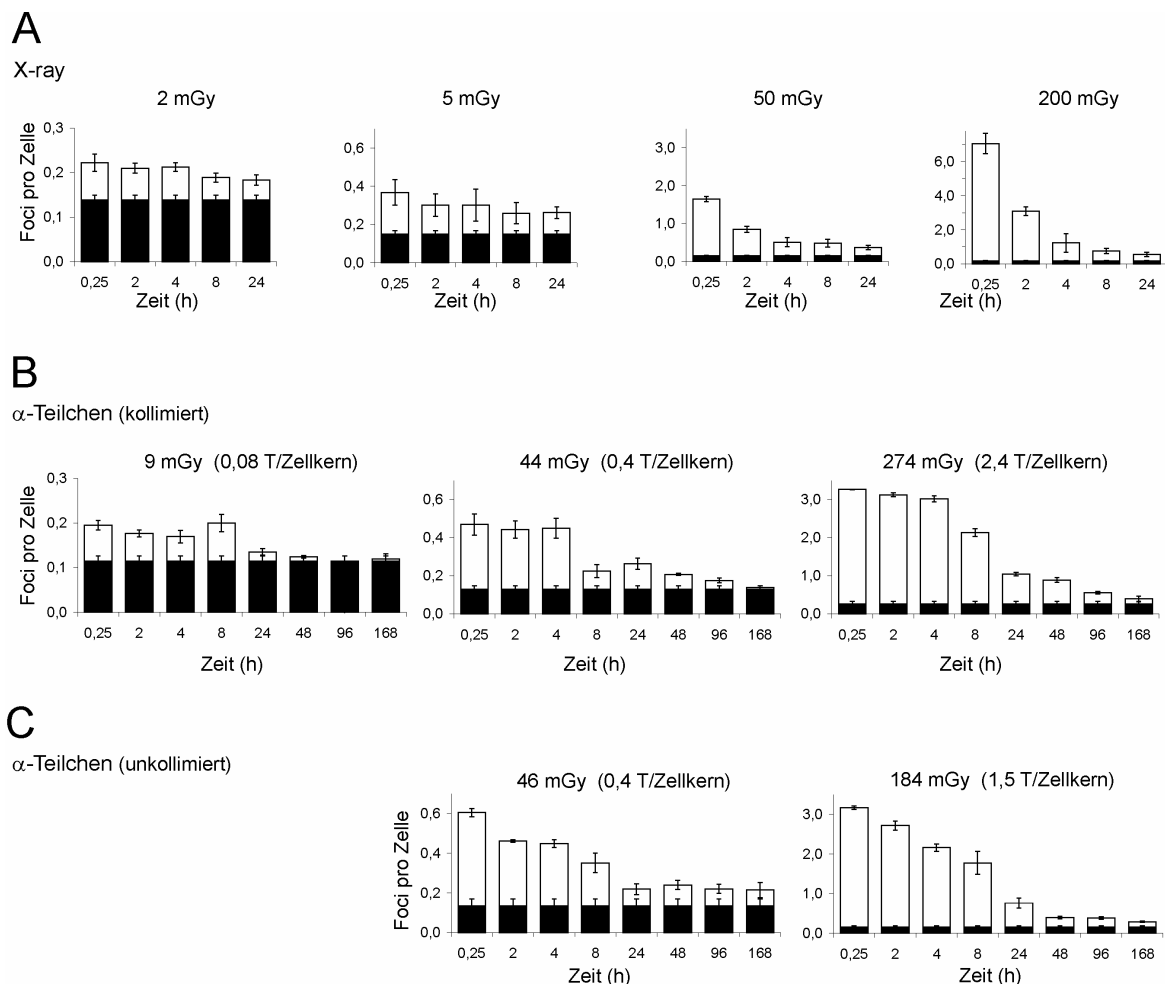


Abb. 3.23: γ -H2AX Foci Reparaturkinetiken nach α -Teilchen- und Röntgenstrahlenexposition von MRC-5 Zellen mit verschiedenen Initialdosen.

Die durch die Strahlung induzierten γ -H2AX Foci werden durch die weißen Säulen wiedergegeben, die gefüllten Säulen zeigen den natürlichen Hintergrundlevel an DNA-DSBs. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler aus 2-6 unabhängigen Experimenten.

4. Diskussion

4.1 Induktion von doppelsträngigen DNA-Fragmenten

Für das Verständnis der Entwicklung einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen oder eines komplexen Organismus ist es von entscheidender Bedeutung, die Organisation und Funktionsweise des Genoms zu verstehen. Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, höher geordnete Chromatinstrukturen mit Hilfe ionisierender Strahlung genauer zu charakterisieren und mit entsprechenden Modellen, wie dem Chromonema, dem RW/GL (*random walk/giant loop*) oder dem MLS (*multi-loop subcompartment*) Modell zu vergleichen. Mithilfe dieser Kenntnis kann z.B. der Einfluss der DNA-Struktur auf verschiedene Aspekte der Genregulation genauer untersucht werden.

Die Struktur der DNA in höheren Eukaryonten wird derzeit in drei verschiedene Stufen unterteilt: die bisher gut charakterisierten Primär- und Sekundärstrukturen und die unter nativen experimentellen Bedingungen noch nicht genau beschriebene Tertiärstruktur. Zur Bestimmung der Tertiärstruktur unter nativen Bedingungen wurden menschliche Zellen mit unterschiedlich dicht ionisierenden Strahlenarten bestrahlt. Nach Isolierung und Größenseparierung der DNA erfolgte mittels Southern-Hybridisierungen eine hochsensitive Detektion der durch die Strahlung generierten dsDNA-Fragmente. Durch eine qualitative und eine quantitative Analyse der dsDNA-Fragmentverteilungen ist es möglich, zwischen dem physikalischen Einfluss der Strahlung und dem biologischen Einfluss der DNA-Struktur auf die Induktion dsDNA-Fragmente zu differenzieren. In Tabelle 4.1 sind die untersuchten Parameter dieser beiden Einflüsse aufgelistet.

Tabelle 4.1: Parameter der DSB-Induktion.

physikalische Parameter	biologische Parameter
<ul style="list-style-type: none">• locker und dicht ionisierende Strahlung• LET der Strahlungen• Dosis bzw. Fluenz	<ul style="list-style-type: none">• Chromatinstruktur• Zellzyklus (Kondensationsgrad)• hetero- und euchromatische DNA-Bereiche• repetitive und nicht-repetitive DNA-Bereiche

4.1.1 Nachweis von inter- und intra-Track-Fragmenten induziert durch dicht ionisierende Strahlung (Modell)

Um aus den experimentell erhaltenen dsDNA-Fragmentverteilungen Hinweise auf den Aufbau höher geordneter Chromatinstrukturen ziehen zu können, ist es notwendig die Entstehung dieser Verteilungen genauer zu verstehen. Da nur korreliert erzeugte DNA-DSBs einen Zusammenhang der räumlichen Anordnung der DNA widerspiegeln können, ist es notwendig diejenigen Fragmente aus den erhaltenen Fragmentverteilungen herauszufiltern, welche auf den DNA-DSBs einer einzelnen Teilchenbahn beruhen (Löbrich *et al.* 1996; Rydberg *et al.* 1998; Rydberg 2001). Fragmente, welche auf nicht korrelierten DNA-DSBs beruhen (auf DNA-DSBs aus 2 Teilchenbahnen), besitzen hingegen keine Information über den strukturellen Aufbau der DNA und führen daher nur zu einem Verwischen der Strukturinformationen in den gemessenen Verteilungen.

Eine einfache und effiziente Möglichkeit der Unterscheidung beider Fragmentarten ergibt sich aus deren Verhalten in Abhängigkeit von der Dosis bzw. von der Fluenz. In Abbildung 4.1 ist diese Beziehung schematisch dargestellt. Hoch-LET Teilchen erzeugen entlang ihrer Bahnspur eine Vielzahl an Ionisationen, die zu korrelierten DNA-DSBs führen. Die Verteilungen der entstehenden dsDNA-Fragmente sind sowohl von den physikalischen Eigenschaften der benutzten Strahlenart als auch von der 3D-Struktur des Chromatins abhängig. Chromatinbereiche, die durch die Chromatinorganisation nahe beieinander liegen (Abb. 4.1: offene Pfeile), besitzen eine höhere Wahrscheinlichkeit, dass durch ein einzelnes Teilchen gleichzeitig ein DNA-DSB in beiden Bereichen induziert wird, als Bereiche, welche sich räumlich weit voneinander entfernt befinden (Abb. 4.1: schraffierte Pfeile). Die Summe aller durch ein Teilchen generierten Fragmente, die intra-Track-Fragmente (Abb. 4.1: grüne Kurven), ergeben zusammen eine typische dsDNA-Fragmentverteilung, wie sie beispielhaft schematisch dargestellt ist. Die Maxima der Verteilungen zeigen häufiger generierte Fragmente auf. Diese erhöhte Fragmentanzahl kann den Einfluss der tertiären Chromatinstruktur auf die räumlich korrelierte DSB-Induktion widerspiegeln (Rydberg *et al.* 1998a; Rydberg *et al.* 1998b; Rydberg 2001). In Abbildung 4.1 ist zum besseren Verständnis und in Übereinstimmung mit den erhaltenen Ergebnissen im betrachteten Größenbereich (48 kbp – 3 Mbp) nur ein Maximum dargestellt. dsDNA-Fragmentverteilungen mit ähnlichen Formen sind bisher auch durch Kraxenberger *et al.* (1998) und Höglund und Stenerlöw (2001) veröffentlicht worden.

Nimmt die Fluenz langsam zu, so verändert sich die Form der erhaltenen dsDNA-Fragmentverteilungen vorerst nicht. Wenn beispielsweise im Mittel statt jedem zweiten

jeder Zellkern von einem Teilchen passiert wird, kommt zur ersten geschädigten Genomregion lediglich eine zweite unabhängig geschädigte Genomregion (bzw. ein ganzes Genom) hinzu. Bei einem gleichen strukturellen Aufbau beider Regionen ist aufgrund der physikalisch vorgegebenen Parameter der Strahlenart mit einer identischen dsDNA-Fragmentverteilung zu rechnen. Allerdings werden insgesamt mehr Fragmente generiert (Abb. 4.1 gestrichelte grüne Kurve). Wird die Fluenz weiter erhöht, führt dies

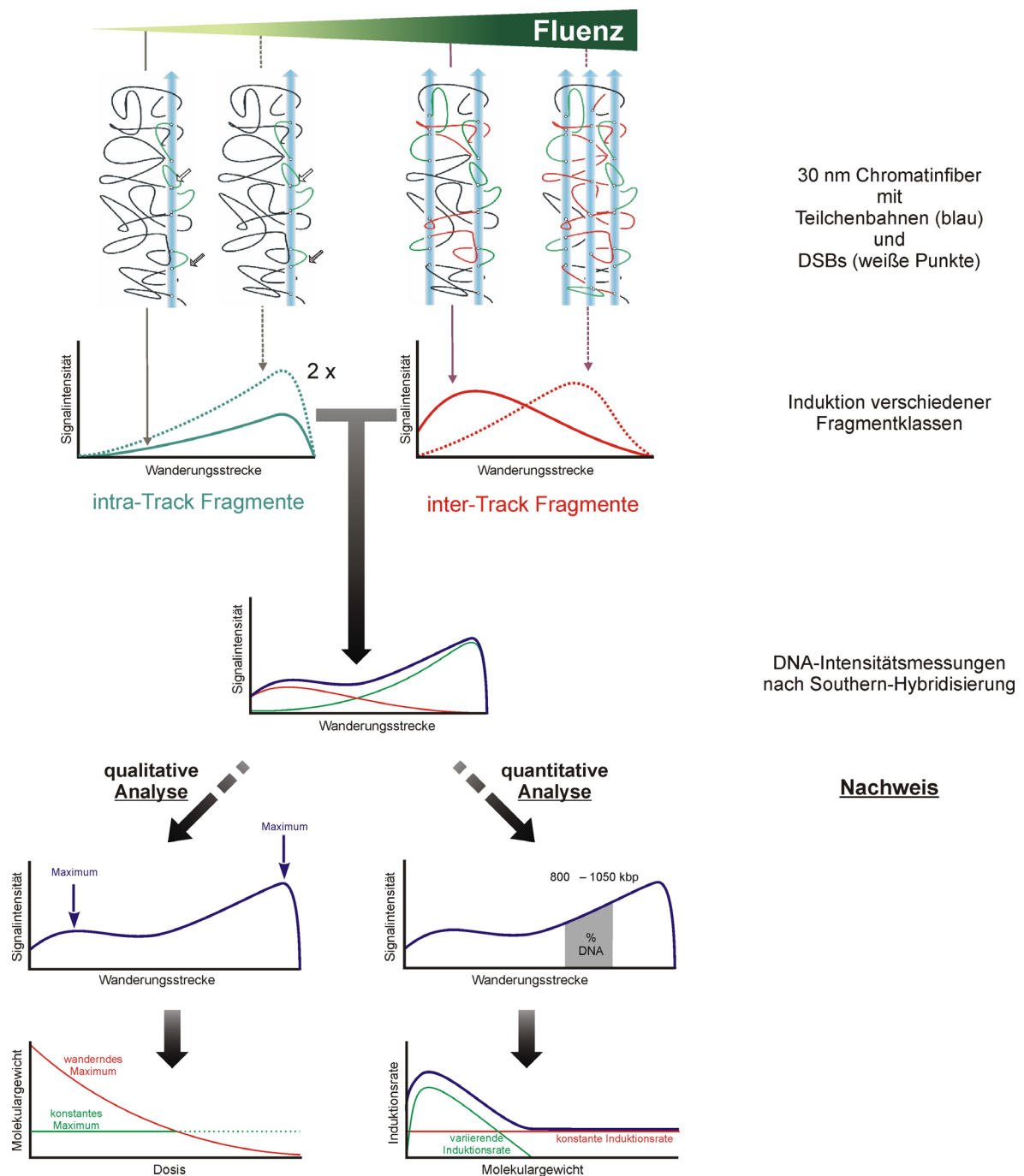


Abb. 4.1: Modell der Induktion von inter- und intra-Track-Fragmenten durch dicht ionisierende Strahlung.
(Erklärung siehe Text.)

dazu, dass im Mittel nun mehrere Teilchen pro Zellkern auftreten. Somit können Fragmente generiert werden, welche auf 2 Teilchenbahnen zurückzuführen sind. Diese inter-Track-Fragmente werden aus nicht miteinander korrelierten DNA-DSBs gebildet. Es ergeben sich Fragmentverteilungen (Abb. 4.1: rote Kurven) ähnlich der der intra-Track-Fragmente. Allerdings deutet das, in diesem Fall einzige Maximum nicht auf eine DNA-Struktur hin, sondern ist vielmehr nur von den physikalischen Parametern der Strahlung abhängig. Dieses Maximum verschiebt sich bei weiterer Erhöhung der Fluenz hin zu kleineren Fragmentgrößen (Abb. 4.1 gestrichelte rote Kurve) und ist daher im Gegensatz zu den Maxima der intra-Track-Verteilungen dosisabhängig. Grundsätzlich sind mit der in dieser Arbeit angewandten Methode jedoch keine Messungen möglich, die auf Bestrahlungen von so niedrigen Fluenzen beruhen, dass nur noch Verteilungen von intra-Track-Fragmenten detektiert werden können. Vielmehr überschneiden sich bei den angewandten Dosen beide Fragmentklassen (Abb.4.1: blaue Kurven) (Stenerlöw *et al.* 1999; Radulescu *et al.* 2004; Belli *et al.* 2006).

Eine Trennung von inter- und intra-Track-Fragmenten ist auf zweierlei Art und Weise möglich. Die erste Möglichkeit ist eine qualitative Analyse der erhaltenen dsDNA-Fragmentverteilungen. Hierbei wird das Verhalten der Maxima in Abhängigkeit von der Fluenz (bzw. von der Dosis) beobachtet. Verändert sich trotz Zunahme der Fluenz das Molekulargewicht des Maximums nicht, beruht dieses auf einer intra-Track-Verteilung. Verschiebt es sich hin zu kleineren Fragmenten beruht es auf einer inter-Track-Verteilung.

Eine quantitative Analyse der dsDNA-Fragmentverteilung stellt eine zweite Möglichkeit der Unterscheidung zwischen beiden Fragmentklassen dar. Für spezifische Fragment-Größenbereiche werden die Induktionsraten bestimmt, indem der DNA-Gehalt in diesen Bereichen für verschiedene Dosen ermittelt und anschließend das RBM (Montroll und Simha 1940; Blöcher 1990) an diese Daten gefittet wird. Aus dem Verhalten der Induktionsraten gegenüber dem Molekulargewicht der untersuchten Fragmentintervalle lässt sich ein Rückschluss auf die Generierung der betrachteten Fragmente ziehen. Inter-Track-Fragmente verhalten sich diesbezüglich wie dsDNA-Fragmente nach locker ionisierender Röntgenstrahlung. Dass heißt die mittels RBM bestimmten Induktionsraten sind unabhängig vom untersuchten Fragment-Größenbereich. Da die Generierung der intra-Track-Fragmente unabhängig von der Fluenz (bzw. der Dosis) ist, kann nicht von einer über die verschiedenen Fragmentintervalle konstanten Induktionsrate ausgegangen werden. Vielmehr ist mit einer Variation dieser zu rechnen. So führen dsDNA-Fragmente, welche aufgrund der Chromatinstruktur vermehrt erzeugt worden sind, zu einem Anstieg der Induktionsrate. Zusätzlich können die Verteilungen der intra-

Track-Fragmente mehrere Maxima besitzen, je nachdem wie die Struktur des Chromatins aufgebaut ist (vergleiche Abb. 1.10) (Rydberg *et al.* 1998a; Rydberg *et al.* 1998b). Die gemessenen Induktionsraten dieser einzelnen Fragmentklasse können sich daher aus mehreren „Teilinduktionsraten“ zusammensetzen (Abb. 1.10).

Ebenso setzen sich die gemessenen Induktionsraten dieser Arbeit im Fragment-Größenbereich von 50 kbp bis 3 Mbp aus mehreren „Teilinduktionsraten“ zusammen, aus der konstanten Induktionsrate der inter-Track-Fragmente und der variierenden Induktionsrate der intra-Track-Fragmente. Für die Aufklärung der Chromatinstruktur ist dies insofern von Bedeutung, da in Fragment-Größenbereichen mit einer konstanten Induktionsrate hauptsächlich inter-Track-Fragmente generiert werden. Das Fehlen von detektierbaren intra-Track-Fragmenten in diesen Bereichen deutet darauf hin, dass entweder keine typischen Chromatinstrukturen in diesem Größenbereich vorhanden sind oder diese sich mittels der in dieser Arbeit benutzten Technik nicht nachweisen lassen.

4.1.2 Einfluss physikalischer Parameter auf die Generierung doppelsträngiger DNA-Fragmente

Um die Einflüsse des unterschiedlichen physikalischen Charakters der verschiedenen Strahlenarten auf die Induktion dsDNA-Fragmente zu untersuchen, wurden die DSB-Induktionsraten der durch PFGE separierten dsDNA-Fragmente durch eine direkte DSB-Quantifizierung ermittelt. Mittels dieser Methode können nahezu alle DNA-DSBs, die zur Bildung von bis zu 6 Mbp langen Fragmenten beitragen, bestimmt werden.

Durch diese Auswertung werden sowohl die DNA-DSBs von inter-Track-Fragmenten, als auch die von intra-Track-Fragmenten erfasst. Da diese zwei unterschiedlichen Fragmentarten experimentell nicht getrennt werden können und zumindest die Generierung von intra-Track-Fragmenten von biologischen Parametern beeinflusst werden kann, ist die direkte DSB-Quantifizierung immer mit einer biologischen Komponente behaftet. Deshalb besteht in lebenden Zellsystemen mit der in dieser Arbeit angewandten Methode keine Möglichkeit, den reinen physikalischen Einfluss der Strahlenparameter auf die Generierung dsDNA-Fragmente zu untersuchen. Ein Vorteil der direkten DSB-Quantifizierung besteht jedoch darin, dass in nahezu allen bisherigen Veröffentlichungen die Induktionsraten durch diese Quantifizierung bestimmt wurden und somit ein sehr guter Literaturvergleich möglich ist.

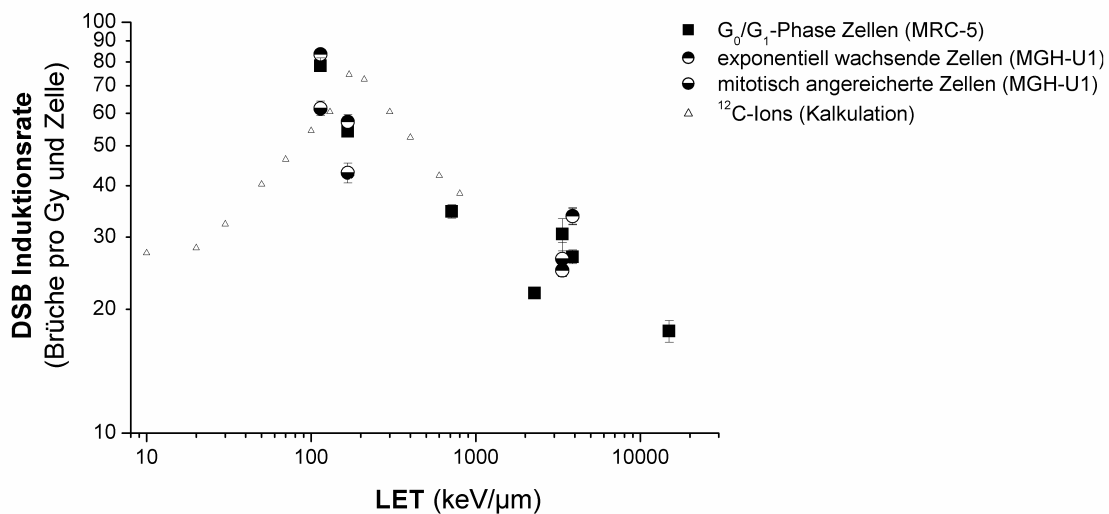


Abb. 4.2: DSB-Induktionsraten aller gemessenen dsDNA-Fragmente bis zu einem Molekulargewicht von ca. 6 Mbp als Funktion des LET.

Abhängigkeit der DSB-Induktionsraten der verschiedenen Strahlenarten ermittelt durch eine direkte DSB-Quantifizierung der dsDNA-Fragmentverteilungen in stationären MRC-5 und in exponentiell wachsenden, sowie mitotisch angereicherten MGH-U1 Zellen. Die Daten der theoretischen Kalkulationen für Kohlenstoff-Ionen wurden aus Chatterjee und Holley (1991) entnommen.

Die direkte Quantifizierung von DNA-DSBs ergibt eine Abhängigkeit der Induktionsraten vom LET der verwendeten Strahlenarten. Mit Zunahme des LET sinkt die Induktionsrate (Br/Gy/Zelle) (Abb. 4.2A). Dies steht scheinbar im Gegensatz zur Arbeit von Löbrich *et al.* (1996), in der eine Erhöhung der Induktionsrate von 74 Br/Gy/Zelle für ¹⁴N-Ionen (97 keV/μm) auf 117 Br/Gy/Zelle für ²⁶Fe-Ionen (150 keV/μm) gemessen wurde. Neuere Veröffentlichungen mit ¹⁴N-Ionen unterschiedlichen LET's zeigen, wie auch die vorliegende Arbeit, eine sinkende Induktionsrate mit Zunahme des LET (von 52 Br/Gy/Zelle bei 80 keV/μm auf 41 Br/Gy/Zelle bei 225 keV/μm) (Höglund *et al.* 2000; Höglund und Stenerlöw 2001). Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit erfolgte in diesen Veröffentlichungen eine Kultivierung der Zellen in einem mit ³H- oder ¹⁴C-angereicherten Medium, wodurch die DNA radioaktiv markiert wurde. Nach Auftrennung der DNA mittels PFGE wurde das Gel anhand verschiedener Größenmarker in mehrere Segmente unterteilt und zerschnitten. Durch Messung der Radioaktivität mit einem Scintillationszähler konnte die DNA-Masse in den so erhaltenen Segmenten bestimmt werden. Die Berechnung der Anzahl an Fragmenten in jedem Segment erfolgte mit der auch in dieser Arbeit benutzten Gleichung (Gl. 2.2).

In Abbildung 4.2 sind alle Induktionsraten der vorliegenden Arbeit als Funktion des LET nochmals graphisch dargestellt. Zusätzlich sind Daten für ¹²C-Ionen mit

unterschiedlichen LET eingefügt, welche auf einer theoretischen Kalkulation der Induktionsraten beruhen (Chatterjee und Holley 1991). Die theoretische Kurve zeigt, dass mit Zunahme des LET zunächst mehr DNA-DSBs induziert werden. Nach Erreichen eines Maximums nimmt die Anzahl an DNA-DSBs pro deponierter Energieeinheit (Gy) ab. Der LET dieses Maximums liegt bei Kohlenstoff-Ionen bei ca. 100 keV/μm. Bei dieser Ionisationsdichte erfolgt etwa alle 2 nm eine Ionisation, was dem Durchmesser der DNA-Doppelhelix entspricht. Durch diese Übereinstimmung der mittleren Ionisationsdichte der Teilchen mit dem Abstand der Zuckerphosphatgerüste der DNA kann die maximale Ausbeute an induzierten DNA-DSBs erklärt werden. Eine weitere Erhöhung des LET führt dazu, dass statt der zwei minimal notwendigen Ionisationsereignisse, welche auf den gegenüberliegenden Seiten der Doppelhelix jeweils einen Einzelstrangbruch verursachen, innerhalb des gleichen Volumens zusätzliche Ionisationen auftreten. Somit nimmt nach Überschreiten eines LET von ca. 100 keV/μm die mittlere deponierte Energie (Dosis) pro DNA-DSB zu. Dadurch sinkt die DSB-Induktionsrate, welche auf der Angabe der Anzahl an generierten DNA-DSBs pro deponierte Energieeinheit beruht (Br/Gy/Gbp) (Günther und Schulz 1983; Hall 2000). Auch die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen mit zunehmenden LET (alle > 100 keV/μm) eine Abnahme der Induktionsrate und stimmen somit mit der theoretischen Kalkulation überein.

Die Angabe der Induktionsrate in Abhängigkeit von der applizierten Dosis ist für eine genaue Aussage über den Grad der DNA-Schädigung durch ein einzelnes Teilchen ungünstig. Der Grund hierfür liegt in der unterschiedlichen Energieverteilung der verschiedenen Strahlenarten. Beispielsweise wird bei einer Energiedosis von 1 Gy etwa jeder fünfzehnte Zellkern (Zellkernfläche: 155 μm²) von einem ²³⁸U-Ion (14925 keV/μm) getroffen. Im Falle von ¹²C-Ionen (167 keV/μm) treten dagegen bei gleicher Energiedosis 6 Teilchen durch jeden einzelnen Zellkern. Das heißt, um die gleiche Anzahl an Teilchendurchgängen von ¹²C-Ionen pro Zellkern zu erreichen wie nach einem Gray ²³⁸U-Ionen, ist lediglich eine Dosis von ca. 1/90 Gy erforderlich. Bei der Angabe der Induktionsraten in Abhängigkeit von der Teilchendichte (Fluenz) (Br/Teilchen/Gbp) ist dieser Faktor bereits enthalten. Dadurch wird es möglich die Anzahl an induzierten DNA-DSBs pro Teilchen für unterschiedliche Strahlenarten direkt miteinander zu vergleichen. In Abbildung 4.3 sind diese Induktionsraten, beruhend auf den Daten der vorliegenden Arbeit, für konfluente MRC-5 Zellen, sowie für exponentiell wachsende und mitotische angereicherte Zellen zusammengefasst dargestellt. Die Werte stimmen mit bisherigen Datensätzen aus der Literatur weitestgehend überein. So liegt die Anzahl der durch ein α-Teilchen induzierten DNA-DSBs mit ähnlichem LET zwischen 5 und 10 Br/Zelle

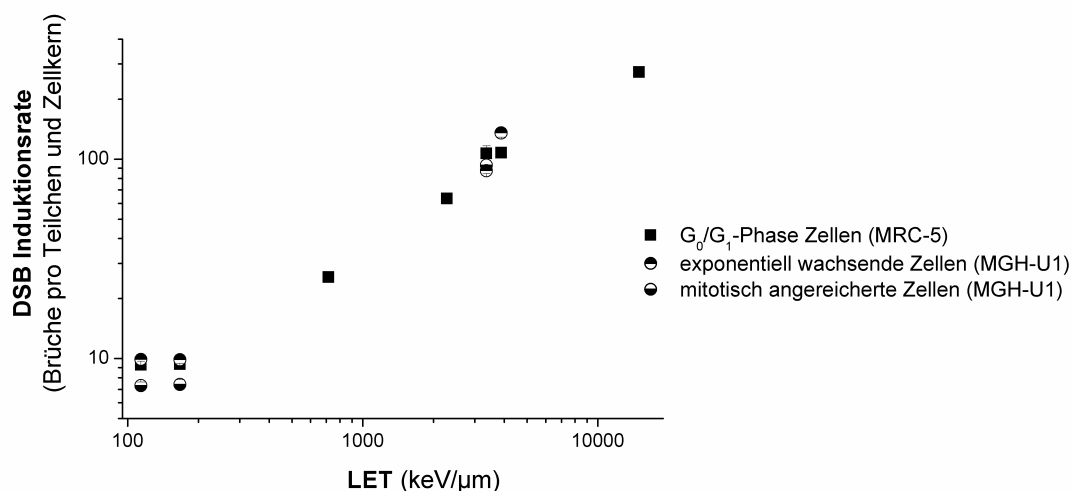


Abb. 4.3: DSB-Induktionsraten aller gemessenen dsDNA-Fragmente bis zu einem Molekulargewicht von ca. 6 Mbp als Funktion des LET.

Abhängigkeit der DSB-Induktionsraten der verschiedenen Strahlenarten ermittelt durch eine direkte DSB-Quantifizierung der dsDNA-Fragmentverteilungen in stationären MRC-5 und in exponentiell wachsenden, sowie mitotisch angereicherten MGH-U1 Zellen.

(Frankenberg *et al.* 1999; Newman *et al.* 2000; Rydberg *et al.* 2002; Pinto *et al.* 2002; Claesson *et al.* 2007).

Dass ein einzelnes Teilchen mit hohem LET mehr DNA-DSBs innerhalb ihrer Bahn durch den Zellkern induziert als ein Teilchen mit niedrigerem LET, wie dies laut theoretischen Modellen zu erwarten war (Chatterjee und Holley 1991; Chatterjee und Holley 1993; Holley und Chatterjee 1996), ist experimentell bereits dokumentiert worden (Rydberg (1996) (97-440 keV/μm), Löbrich *et al.* 1996 (97-150 keV/μm); Höglund *et al.* (2000) (40-225 keV/μm) sowie Höglund und Stenerlöw (2001) (80-225 keV/μm)). Die in diesen Veröffentlichungen gezeigten Daten werden durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt. Die mit zunehmenden LET erhöhte Induktion von DNA-DSBs pro Teilchen beruht hierbei auf der einfachen Tatsache, dass mit zunehmendem LET die Ionisationsdichte entlang der Teilchenbahn zunimmt und somit die Wahrscheinlichkeit der Induktion von mindestens zwei Einzelstrangbrüchen, welche sich auf gegenüberliegenden Seiten der DNA-Doppelhelix befinden, ansteigt.

Zusätzlich muss noch berücksichtigt werden, dass, wie oben beschrieben, mit zunehmendem LET (für ¹²C-Ionen > 100 keV/μm) die Dosis, welche in dem Volumen eines einzelnen DNA-DSB deponiert wird, ebenfalls zunimmt. Demnach kann auch aus dem reinen Verhältnis des LET der unterschiedlichen Strahlenarten keine Schlussfolgerung über die Anzahl an generierten DNA-DSBs, beruhend auf einer einzigen Strahlenart, gezogen werden. So wird in der vorliegenden Arbeit beispielsweise

gezeigt, dass ein einzelnes ^{238}U -Ion lediglich 30mal mehr DNA-DSBs induziert als ein ^{12}C -Ion (Abb. 4.3), obwohl das Verhältnis des LET beider Strahlenarten bei 90 zu 1 liegt.

Die mit zunehmendem LET steigende Anzahl an DNA-DSBs muss jedoch nicht unbedingt nur auf den physikalischen Eigenschaften der Strahlungen beruhen. Durch eine Erhöhung des LET liegen die induzierten DNA-DSBs immer enger beisammen. Dadurch kann sich verstärkt der Einfluss der Chromatinstruktur auf die Induktion der DNA-DSBs bemerkbar machen. So kann es beispielsweise an kritischen Punkten, wie den *loop-attachment-points*, im Vergleich zu „freiliegender“ DNA zu einer überproportionalen DSB-Induktion kommen.

4.1.3 Einfluss biologischer Parameter auf die Generierung von doppelsträngiger DNA-Fragmente

Die Generierung von Fragmenten durch ionisierende Strahlung, die auf korrelierte DNA-DSBs zurückzuführen sind, nutzte 1998 bereits B. Rydberg zum Nachweis der strukturellen Anordnung der Nukleosomen in einer Zick-Zack Struktur (Rydberg *et al.* 1998a; Rydberg *et al.* 1998b; Rydberg 2001). In dieser Arbeit werden durch ionisierende Strahlung induzierte einzelsträngige DNA-Fragmente beschrieben, die auf einer Clusterung der DNA-Schäden innerhalb einer DNA-Länge bis zu 2 kbp beruhen. Diese wurden mittels einer denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese nachgewiesen. Dabei ergaben sich für typische Chromatinstrukturen überproportional viele einzelsträngige DNA-Fragmente (siehe Abb. 1.10B). Die in diesen Veröffentlichungen genutzte Beziehung zwischen der Chromatinorganisation und der entsprechenden Induktion von DNA-Doppel- und Einzelstrangbrüchen wurde in der vorliegenden Arbeit auf die Untersuchung größerer Chromatinstrukturen übertragen. Die erhaltenen dsDNA-Fragmentverteilungen wurden dabei unter Berücksichtigung der Strahlenqualität, des Kondensationsgrades des Chromatins und des Einflusses der Transkriptionsaktivität der DNA untersucht.

Der Nachweis von dsDNA-Fragmenten erfolgte mittels qualitativer und quantitativer Analyse der erhaltenen dsDNA-Fragmentverteilungen. Die qualitative Analyse der erhaltenen Fragmentverteilungen ermöglicht es zwischen zwei verschiedenen Fragmentklassen zu unterscheiden. Zum einen entstehen inter-Track-Fragmente, welche durch zwei Teilchenspuren erzeugt werden, LET abhängig sind und mit Zunahme der Fluenz sich zu kleinerem Molekulargewicht hin verschieben. Zum anderen treten intra-

Track-Fragmente auf, die auf einer einzelnen Teilchenspur beruhen, LET unabhängig sind (siehe Abb. 3.7 und Abb. 3.15) und keine Abhängigkeit des Molekulargewichts von der Fluenz zeigen. Die quantitative Analyse beruht auf der Ermittlung der Induktionsraten in spezifischen Fragment-Größenbereichen. Bei einer rein stochastischen Induktion von DNA-DSBs sollten die Induktionsraten unabhängig vom betrachteten Größenbereich sein. Besitzt eine höher geordnete Chromatinstruktur oder besitzen andere biologische Parameter Einfluss auf die Generierung dsDNA-Fragmente, ist mit einem Anstieg der Induktionsrate in Fragment-Größenbereichen zu rechnen die der spezifischen strukturell bedingten DNA-Organisation entsprechen.

Durch die quantitative Analyse konnte in konfluenten MRC-5 Zellen gezeigt werden, dass im Vergleich zu Fragment-Größenbereichen > 1 Mbp alle untersuchten Strahlenarten einen signifikanten Anstieg der Induktionsraten in Größenbereichen kleiner 1 Mbp aufweisen (siehe Abb. 3.5). Eine Variation der Induktionsraten bedeutet wiederum, dass in diesen Bereichen, neben inter-Track-Fragmenten mit konstanten Induktionsraten, eine weitere Fragmentklasse mit einer variierenden Induktionsrate generiert wird, die intra-Track-Fragmente.

Dieses Ergebnis der zusätzlichen Generierung von dsDNA-Fragmenten in Größenbereichen kleiner 1 Mbp konnte durch die qualitative Analyse bestätigt werden. So ist unterhalb eines Molekulargewichtes von 1 Mbp ein konstantes Maximum der dsDNA-Fragmentverteilungen erkennbar. Dieses Maximum ist nicht nur unabhängig von der Dosis, sondern auch unabhängig vom LET der Strahlung. So zeigen alle benutzten Strahlenqualitäten bei einem Molekulargewicht von ca. 500 kbp eine überproportionale Generierung dsDNA-Fragmente (Abb. 3.8). Diese, unabhängig von den physikalischen Eigenschaften der Strahlung induzierten, dsDNA-Fragmente besitzen die charakteristische Größe einer Chromatindomäne, welche am ehesten dem MLS Modell der Struktur höher geordneter Chromatinorganisationen entspricht (Tumbar *et al.* 1999; Münkel *et al.* 1999; Müller *et al.* 2001; Horn und Peterson 2002). Dadurch liegt es nahe, dieser Struktur den beobachteten Anstieg der Generierung von dsDNA-Fragmenten mit einem Molekulargewicht von ca. 500 kbp zuzuschreiben. Weitere Veröffentlichungen beschreiben ebenfalls eine detektierbare Struktur in diesem Größenbereich. So identifizierte Müller *et al.* (2004) eine 440 kbp große DNA-Regionen auf dem 22. menschlichen Chromosom, welche 6 Gene beinhaltet und zu 40% aus deren kodierenden Sequenz besteht, sowie eine 375 kbp große DNA-Regionen auf dem 6. Chromosom, welche 10 Gene beinhaltet und zu 80% aus deren kodierenden Sequenz besteht. Somit scheint die Größe der tertiären Chromatinstruktur abhängig von der

Dichte von Gen-kodierenden Sequenzen zu sein. DNA-Regionen, welche keine oder sehr wenig Gene enthalten, können so bis zu 2 Mbp umfassen (Tumbar *et al.* 1999; Tsukamoto *et al.* 2000; Müller *et al.* 2001; Janicki *et al.* 2004).

In einer Anzahl an weiteren Veröffentlichungen wurde eine erhöhte Induktionsrate für dsDNA-Fragmente kleiner 1 Mbp beobachtet und diese in Verbindung mit der Chromatinstruktur gebracht. Hierbei spielte zum Beispiel die Form der erhaltenen dsDNA-Fragmentverteilungen eine Rolle. Diese zeigen bei einem Vergleich mit theoretischen Verteilungen, berechnet nach dem RBM, eine überproportionale Generierung von kleinen Fragmenten (< 1 Mbp) (Kraxenberger *et al.* 1998; Höglund *et al.* 2000; Newman *et al.* 2000; Höglund und Stenerlöw 2001). Des Weiteren wurden für verschiedene Strahlenarten auch die DSB-Induktionsraten in unterschiedlichen Fragmentintervallen gemessen. Diese Messungen zeigen übereinstimmend einen signifikanten Anstieg der DSB-Induktionsraten für Fragmente kleiner 1 Mbp (Löbrich *et al.* 1996; Pinto *et al.* 2002; Rydberg *et al.* 2002; Belli *et al.* 2006). Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit kann diese überproportionale Generierung von kleinen dsDNA-Fragmenten eindeutig auf eine biologische Strukturkomponente zurückgeführt werden.

Die, in dieser Arbeit beobachtete, Differenz zwischen dem Maximum der dsDNA-Fragmentverteilungen der qualitativen Analyse (0,5 Mbp) und dem Beginn der Zunahme der Induktionsraten der quantitativen Analyse (1 Mbp) kann auf eine normale Größenverteilung der generierten intra-Track-Fragmente zurückgeführt werden. So können durchaus durch ein einzelnes Teilchen dsDNA-Fragmente erzeugt werden, welche ein Molekulargewicht von weniger als 50 kbp besitzen aber auch Fragmente, die bis zu 2 Mbp groß sind.

Im Vergleich zum relaxierten Chromatin in ruhenden Zellen wurde in mitotisch angereicherten Zellen stark kondensiertes Chromatin untersucht. Die Synchronisation der Zellen erfolgte unter Verwendung des spindelfaserabbauenden Zellgifts Nocodazol. Durch eine 16 bis 24stündige Einwirkung des Agens konnten ca. 80% der Zellen der Blasenkarzinomzelllinie MGH-U1 in der Mitose angereichert werden. Parallel wurden exponentiell wachsende MGH-U1 Kulturen, in denen sich ca. 50% der Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklus befanden und jeweils ca. 25% in der S- und G₂/M-Phase, mit identischen Dosen bestrahlt.

Sowohl die qualitative als auch die quantitative Analyse zeigt im Vergleich zwischen ruhenden MRC-5, mitotisch angereicherten und exponentiell wachsenden MGH-U1 Kulturen keinen signifikanten Unterschied der Induktion von DNA-DSBs. In allen drei untersuchten Populationen konnte ein von der Strahlenart unabhängiger Anstieg der

Induktionsrate unterhalb eines Mbp nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.5 und 3.13). Auch bleibt das Molekulargewicht der Maxima der intra-Track-Fragmente der dsDNA-Fragmentverteilungen unverändert. In allen drei bestrahlten Zellpopulationen ergibt sich ein von den physikalischen Parametern der Strahlung unabhängiges Maximum mit einem Molekulargewicht von ca. 500 kbp (siehe Abb. 3.7 und 3.15).

Diese nahezu identischen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Tertiärstruktur des Chromatins im betrachteten Fragment-Größenbereich im Laufe des Zellzyklus vom variierenden Kondensationsgrad der DNA nicht beeinflusst ist. Demnach scheint die Kondensation der Chromosomen, vom relaxierten Zustand während der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus zum stark kondensierten Zustand der Metaphasechromosomen, unabhängig von der tertiären Chromatinstruktur zu sein. Wahrscheinlich kann sie auf eine einfache Kompression der DNA zurückgeführt werden, welche nach dem Ziehharmonika-Prinzip funktionieren könnte. Hervorgerufen werden kann diese Kompression zum Beispiel durch eine Änderung des umgebenden Mediums der DNA (Ljungman 1991; Fan *et al.* 2002), durch eine Variation des Linker Histons H1 (Carruthers *et al.* 1998; Carruthers *et al.* 2000; Green *et al.* 2001), durch eine Variation der Histone der Nukleosomen (Clarkson *et al.* 1999; Adam *et al.* 2001) oder auch durch Proteine der „scaffold“-Matrix (Mirkovich *et al.* 1984; Bustin 2001). Im Falle einer solch einfachen Kompression wäre nicht mit einem deutlich messbaren Unterschied zwischen den verschiedenen Fragmentverteilungen zu rechnen, da im Mittel die DNA im gleichen Maße geschädigt wird. Zum Beispiel führt eine Verringerung des DNA-Volumens um 50% dazu, dass sie nur noch von ca. der Hälfte der Teilchen geschädigt wird. Gleichzeitig verursacht ein einzelner Treffer jedoch den doppelten Schaden, der zweite Treffer erzeugt „keinen“ Schaden, wodurch das Schadenslevel unverändert bleibt.

Neben der Änderung des Kondensationsgrades der DNA durch den Zellzyklus unterliegt diese selbst einer strukturellen intragenomischen Varianz. So existieren neben hetero- und euchromatischen Bereichen auch repetitive und nicht-repetitive Sequenzbereiche. Mittels der in dieser Arbeit verwendeten Technik der Southern-Hybridisierung war es möglich, durch spezifische DNA-Sonden diese unterschiedlichen Bereiche separat zu untersuchen. Hierbei wurde durch die Verwendung der ³²P-markierten Hybridisierungssonden D21S1, D21Z1 und 18S-rDNA eine durchschnittliche, eine repetitive heterochromatische und eine repetitive euchromatische DNA-Region markiert. Die erhaltenen dsDNA-Fragmentverteilungen als Funktion der Wanderungsstrecke sind mit den Signalen der Hybridisierungen mit genomischer DNA verglichen und analysiert worden.

Wie auch bei der Änderung des Kondensationsgrades im Laufe des Zellzyklus ist die Generierung von dsDNA-Fragmente durch dicht ionisierende Strahlungen unabhängig von der Genomregion. Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen dsDNA-Fragmentverteilungen der unterschiedlichen Hybridisierungsansätze erkennbar gewesen (siehe Abb. 3.17 und 3.18). Diese Unabhängigkeit der DSB-Induktion von den untersuchten Genomregionen wird in der Literatur bisher nur nach Röntgenbestrahlung beschrieben. So konnte anhand der Hybridisierungssonden D21S1 und D21Z1 sowohl in MRC-5 als auch in MGH-U1 Zellkulturen bereits eine nahezu identische Induktionsrate für diese zwei unterschiedlichen Genomregionen demonstriert werden (Löbrich *et al.* 1996; Rothkamm und Löbrich 1999; Hattori *et al.* 2000; Rief *et al.* 2002).

Die identischen Formen der dsDNA-Fragmentverteilungen nach Hybridisierung mit verschiedenen Sonden deuten darauf hin, dass nicht nur die Generierung von inter-Track-Fragmenten unabhängig von der DNA-Region ist, sondern auch dass die von biologischen Parametern beeinflusste Generierung von intra-Track-Fragmenten unabhängig vom untersuchten Genombereich ist. Dies erlaubt die Annahme, dass innerhalb des gesamten Genoms eine einheitliche tertiäre Chromatinstruktur mit einer DNA-Länge von ca. 500 kbp existiert. Dies widerspricht scheinbar bisherigen Veröffentlichungen, die mittels Fluoreszenzmarkierung in transkriptionsaktiven DNA-Bereichen im Vergleich zu inaktiven DNA-Bereichen eine größere räumliche Ausbreitung der DNA nachweisen konnten (Tsukamoto *et al.* 2000; Müller *et al.* 2001; Janicki *et al.* 2004; Müller *et al.* 2004). Auf Grundlage dieser Arbeiten hätte mit einer Variation der Form der dsDNA-Fragmentverteilungen gerechnet werden können. Um diesen scheinbaren Widerspruch zwischen den veröffentlichten Fluoreszenz-Daten und der vorliegenden Arbeit erklären zu können, erscheint eine Interpretation beider Daten über die verschiedenen Modelle der tertiären Chromatinstruktur zweckmäßig.

Im Falle einer Dekondensation eines DNA-Bereiches, wie z.B. in transkriptionsaktiven DNA-Bereichen, nimmt das Volumen, welches diesen DNA-Bereich beinhaltet, zu. Befindet sich der DNA-Bereich im kondensierten Zustand, ist das betreffende Volumen klein. Studien, welche auf der Methode der Fluoreszenzmikroskopie beruhen, markieren in der Regel größere DNA-Bereiche (bis zu mehreren 100 kbp). Befindet sich der zu messende DNA-Bereich im kondensierten Zustand, ergibt sich, aufgrund der Ballung des markierten Bereiches auf einen eng begrenzten Raum, ein gut detektierbares Fluoreszenzsignal. Ist der DNA-Bereich hingegen dekondensiert, verteilt sich das Fluoreszenzsignal über ein größeres Volumen, so dass es kaum oder gar nicht mehr detektiert werden kann. Bei einer Dekondensation eines Teils des markierten DNA-

Bereiches erfolgt eine Teilung des zuvor gut sichtbaren Signals in mehrere kleine Signale über ein größeres Volumen (Müller *et al.* 2004).

Wird von einer tertiären DNA-Struktur dem Chromonema Modell folgend ausgegangen, einer einfachen spiralartigen Form der 30 nm Chromatinfiber, beträgt eine Windung nach den Daten der vorliegenden Arbeit ca. 500 kbp, was dem Maximum der Verteilung der intra-Track-Fragmente entspricht. Entspiralisiert nun ein Teil dieser Spirale sollte sich dieses Maximum selbst nicht verschieben, da eine ganze Windung immer noch 500 kbp beträgt. Da jedoch ein Teil der Chromonema entspiralisiert ist, sinkt die Wahrscheinlichkeit der Generierung von intra-Track-Fragmenten mit der charakteristischen Größe von 500 kbp. Weist beispielsweise der entspiralisierte Teil keine Schädigung auf, könnten vermehrt Fragmente der doppelten Länge (zwei Windungen) entstehen. Somit wäre bei einer Sonde, welche einen transkriptionsaktiven DNA-Bereich ($\hat{=}$ Entspiralisierung) markiert (z.B.: 18s-rDNA), zu erwarten, dass der prozentuale DNA-Anteil des Maximums unter dem prozentualen DNA-Anteil der Markierung mit der gesamten genomischen DNA liegt. Demzufolge kann auch mit einer veränderten Induktionsrate von DNA-DSBs in diesen spezifischen Fragment-Größenbereichen gerechnet werden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das Maximum der intra-Track-Fragmente seine typische Größe von 500 kbp unabhängig von der verwendeten Sonde beibehält (Abb. 3.18). Die Anzahl an generierten dsDNA-Fragmenten (Induktionsraten) ist somit unabhängig von der untersuchten Genomregion. Dies ist nicht dem Chromonema Modell konsistent, nach welchem unterschiedliche Induktionsraten in DNA-Bereichen mit unterschiedlichen Transkriptionsaktivitäten zu erwarten gewesen wären.

Sowohl das RW/GL als auch das MLS Modell gehen von einem Aufbau der tertiären Chromatinstruktur in Loops aus. Der entscheidende Unterschied zwischen beiden Modellen besteht in der Nicht-Differenzierung bzw. der Differenzierung von Unterstrukturen in den Loops. Die Daten der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass ein durchschnittlicher derartiger Loop ca. 500 kbp groß sein könnte (Maximum der intra-Track-Fragmente (Abb. 3.7 und Abb. 3.15)). Die Endpunkte eines solchen Loops (*loop-attachment-points*), welche bei der Erzeugung der spezifischen intra-Track-Fragmente von 500 kbp Länge eine essentielle Rolle spielen, befinden sich hierbei ständig in einer relativ konstanten geometrischen Distanz zueinander. Demnach sollte die Größe, wie auch die Anzahl an intra-Track-Fragmenten unabhängig von der Transkriptionsaktivität der untersuchten DNA-Region sein. Die Daten der vorliegenden Arbeit stimmen mit diesen Annahmen überein, so dass zum derzeitigen Zeitpunkt eines dieser zwei Modell favorisiert werden kann.

In transkriptionsaktiven DNA-Bereichen findet eine Streckung der DNA hauptsächlich in den Loops selbst statt. Folgt der Aufbau eines Loops hierbei dem RW/GL Modell, ist bei fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen von tertiären DNA-Strukturen mit einer Abnahme des detektierbaren Fluoreszenzsignals zu rechnen. Diese Abnahme beruht darauf, dass sich das zuvor große und gut detektierbare Fluoreszenzsignal nun auf ein größeres Volumen verteilt. Trifft jedoch eher das MLS Modell zu und wird vorausgesetzt, dass die Loops innerhalb eines *subcompartments*, welches nach der vorliegenden Arbeit 500 kbp groß ist, sich gegeneinander verschieben können, ist folgendes vorstellbar: Durch eine Dekondensation eines Teils des 500 kbp großen *subcompartments* erfolgt eine räumliche Verschiebung der im *subcompartment* enthaltenen kleineren Loops von 100 bis 200 kbp. Dies würde bei einer Fluoreszenzmarkierung des gesamten *subcompartments* dazu führen, dass aus dem zuvor großen und gut detektierbaren Fluoreszenzsignal mehrere kleinere Signale entstehen können. Die Anzahl der entstehenden Signale ist dabei abhängig von der Größe des *subcompartments* und von der Größe der kleineren Loops. So sollten nach den obigen Größenangaben in transkriptionsaktiven DNA-Bereichen etwa 2-5 kleine Signale detektierbar sein. Das ist konsistent mit den mittels FISH gemessenen Daten durch Müller *et al.* (2004).

Dies deutet darauf hin, dass die höher geordnete Chromatinstruktur durch das MLS Modell besser beschrieben wird als durch das RW/GL Modell.

Inwiefern der Abstand zwischen den *loop-attachment-points* zweier benachbarter Loops jedoch variiert oder ob dieser konstant ist, kann durch die vorliegende Arbeit nicht geklärt werden. So ist es durchaus vorstellbar, dass es z.B. durch „tertiäre Linker-DNA-Strukturen“ zu einer räumlichen Verschiebung benachbarter Loops gegeneinander kommen kann.

4.2 Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

Die Reparatur von DNA-DSBs spielt für das Überleben eines Organismus eine entscheidende Rolle. Dabei müssen sowohl durch exogene Agenzien als auch durch endogene Prozesse induzierte DNA-DSBs schnell und effektiv erkannt und beseitigt werden. Fehler innerhalb der Reparatursysteme können zu verschiedensten Erbkrankheiten führen. So ist es insbesondere für die Risikoabschätzung strahlenexponierter Personen wichtig zu wissen, welche Mechanismen bei der Reparatur der Brüche zum Tragen kommen und wie diese Mechanismen funktionieren (Khanna

und Jackson 2001; van Gent *et al.* 2001; Wood *et al.* 2001; Jackson 2002; Friedberg 2003; Gasser und Raulet 2006). Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit nicht nur die Induktion, sondern auch die Reparatur von DNA-DSBs untersucht.

4.2.1 Reparatur von doppelsträngigen DNA-Fragmenten

Es ist seit einigen Jahren bekannt, dass die Reparatur von DNA-DSBs erzeugt durch hoch-LET Teilchen langsamer abläuft als die Reparatur von DNA-DSBs, welche durch Röntgen- oder γ -Strahlung induziert werden (Ritter *et al.* 1977; Blöcher 1989; Rydberg *et al.* 1998a; Stenerlöv 2002). Die Ursache hierfür kann die mit steigendem LET zunehmende Komplexität der einzelnen DNA-Läsionen sein (Chatterjee und Holley 1991; Goodhead 1994).

Neben der Abhängigkeit der DSB-Reparatur von der Strahlenart kann die Reparatur auch von der strukturellen Organisation der DNA selbst beeinflusst sein. So können Proteine, welche an die DNA gebunden sind, als Radikalfänger wirken und die aus der Radiolyse des Wassers stammenden Radikale abfangen. Dadurch wird eine Minderung der Schädigung der DNA durch den indirekten Strahleneffekt erreicht (Ward 1988; Ljungman 1991; Newman *et al.* 2000; Ahnström *et al.* 2000). Diese Minderung der DNA-Schädigung kann dazu führen, dass DNA-DSBs an geschützten Stellen weniger komplex sind als an ungeschützten Stellen. Zudem könnte die strukturelle Organisation der DNA eine mögliche Diffusion der freien DNA-Enden des Bruches verhindern, so dass deren Verbinden keine zusätzliche Zeit für eventuelle Suchmechanismen benötigt (Berkovich *et al.* 2007).

In der vorliegenden Arbeit ist zum einen die Reparatur von dsDNA-Fragmenten in Abhängigkeit von der Komplexität der induzierten DNA-DSBs untersucht worden. Hierzu wurden MRC-5 Zellen mit verschiedenen Strahlenarten mit unterschiedlichem LET bestrahlt. Zum anderen fand eine Untersuchung des Einflusses der Chromatinstruktur auf die Reparatur von dsDNA-Fragmenten statt, wobei für verschieden dicht ionisierende Strahlenarten die Reparaturkinetiken in verschiedenen Fragment-Größenbereichen ermittelt worden sind.

Die Reparatur von dsDNA-Fragmenten wurde in drei verschiedenen Fragment-Größenbereichen untersucht. Diese Bereiche wurden so gewählt, dass im ersten Bereich bei entsprechend niedriger Dosis die Reparatur von „reinen“ intra-Track-Fragmenten messbar ist. Ein weiterer Bereich umfasste bei gleicher Initialdosis hauptsächlich inter-

Track-Fragmente. Im letzten Bereich, welcher zwischen diesen beiden lag, wurden sowohl inter- als auch intra-Track-Fragmente induziert (Abb. 3.20A). Zusätzlich wurde die DSB-Reparatur noch bei einer höheren Dosis gemessen. Diese hohe Initialdosis wurde so gewählt, dass die Verteilung der intra-Track-Fragmente durch die Verteilung der inter-Track-Fragmente in allen Fragment-Größenbereichen überlagert wird (Abb. 3.20B). Die Nutzung einer niedrigen und einer hohen Dosis, sowie die Trennung in die entsprechenden Fragment-Größenbereiche ermöglichen eine gezielte Untersuchung der DSB-Reparatur in Abhängigkeit von den physikalischen Eigenschaften der Strahlungen und dem biologischem Einfluss der Chromatinstruktur.

Für die Untersuchung der DSB-Reparatur in Abhängigkeit von den physikalischen Eigenschaften der Strahlung, wie dem LET oder der Dosis, ist es sinnvoll sich auf dsDNA-Fragmente zu konzentrieren, deren Generierung weniger von biologischen Parametern beeinflusst ist. Dass die Bildung von „intra-Track-Fragmenten“ unter dem biologischen Einfluss der Chromatinstruktur steht, konnte bereits in anderen Arbeiten gezeigt werden (Rydberg *et al.* 1998a; Rydberg 2001), daher entfällt diese Fragmentklasse. Dagegen unterliegt die Generierung von inter-Track-Fragmenten hauptsächlich den physikalischen Parametern der verschiedenen Strahlenarten, wodurch deren Reparatur als Referenz für die Abhängigkeit der DSB-Reparatur von den physikalischen Eigenschaften der Strahlungen dienen kann.

Im Fragment-Größenbereich von 1050 kbp bis 3130 kbp in Abbildung 3.20A und 3.20B werden hauptsächlich inter-Track-Fragmente induziert. Diese zeigen mit zunehmendem LET und somit der zunehmenden Schadenskomplexität eine verlangsamte DSB-Reparatur.

Diese Abhängigkeit der DSB-Reparatur vom LET der Strahlung konnte schon durch Messungen mit ^{14}N -Ionen nachgewiesen werden (dsDNA-Fragmente >500 kbp) (Höglund und Stenerlöv 2001; Stenerlöv und Höglund 2002). So verbleiben beispielsweise 2 h nach Bestrahlung mit ^{14}N -Ionen (750 Teilchen/Zellkern; 80 keV/ μm) ca. 20% und 2 h nach Bestrahlung mit ^{14}N -Ionen (750 Teilchen/Zellkern; 175 keV/ μm) ca. 40% der induzierten DNA-DSBs unrepariert (siehe auch Abb.1.14). In der vorliegenden Arbeit verbleiben 2 h nach Bestrahlungen mit ^{12}C -Ionen (1100 Teilchen/Zellkern; 167 keV/ μm) ebenfalls ca. 40% der induzierten DNA-DSBs unrepariert. Diese Abhängigkeit der DSB-Reparatur (DNA-DSBs von inter-Track-Fragmenten) vom LET der Strahlung deutet darauf hin, dass die mit steigendem LET steigende Komplexität der Brüche hierfür verantwortlich ist. So werden mit steigendem LET in der Umgebung des DNA-DSBs zusätzliche Schäden, wie weitere DNA-DSBs,

Einzelstrangbrüche, Basenschädigungen, etc. induziert. Diese können dazu beitragen, dass der Reparaturprozess der geschädigten Stelle zunächst einer weitergehenden zeitaufwendigen Prozessierung bedarf. Dies wird durch Daten bestätigt, die nachweisen, dass zur Reparatur von komplexen Brüchen im Vergleich zu einfachen Brüchen zusätzliche Reparaturkomponenten benötigt werden, welche die Bruch-Enden prozessieren können (Kühne *et al.* 2004; Riballo *et al.* 2004; Löbrich und Jeggo 2005a).

Neben der Abhängigkeit der Reparatur von inter-Track-Fragmenten vom LET der Strahlung ist auch deren Abhängigkeit von der applizierten Dosis untersucht worden. Im Fragment-Größenbereich von 1050 kbp bis 3130 kbp („reine“ inter-Track-Fragmente) ist nach zwei unterschiedlichen Initialdosen keine signifikante Differenz der, für jede Strahlenart spezifischen, Reparaturkinetiken erkennbar (Abb. 3.20). So verbleiben trotz Verdopplung der Dosis 24 h nach Bestrahlung mit ^{12}C -Ionen (167 keV/ μm) ca. 20% der erzeugten inter-Track-Fragmente unrepariert. Bei Bestrahlungen mit ^{124}Sn -Ionen (8000 keV/ μm) bzw. ^{132}Xe -Ionen (8816 keV/ μm) werden trotz Verdreifachung der Dosis jeweils ca. 55% der generierten dsDNA-Fragmente innerhalb von 24 h nicht repariert (Abb. 3.20). Dies deutet darauf hin, dass die Reparatur von DNA-DSBs, welche inter-Track-Fragmente bilden, weitestgehend unabhängig von der applizierten Dosis bzw. der applizierten Fluenz ist.

Die DNA-DSBs von inter-Track-Fragmenten korrelieren nicht miteinander, das heißt, sie sind unabhängig voneinander induziert worden. Gleiches gilt für die DNA-DSBs von dsDNA-Fragmenten, welche durch Röntgenstrahlung generiert werden. Dadurch ist es möglich die Reparatur von inter-Track-Fragmenten mit der DSB-Reparatur nach Röntgenbestrahlung zu vergleichen. In der vorliegenden Arbeit wird eine Dosis-unabhängige Reparatur der inter-Track-Fragmente beobachtet (Fragment-Größenbereich von 1050 kbp - 3130 kbp). Dies entspricht ebenfalls bisher veröffentlichten Daten nach Röntgenbestrahlungen, welche zeigen, dass die Reparatur von dsDNA-Fragmenten in MRC-5 Zellen unabhängig von der applizierten Dosis ist (10 Gy bis 80 Gy) (Kühne *et al.* 2004).

Des Weiteren wurde in der Literatur gezeigt, dass die Reparatur nach Röntgenbestrahlung weitestgehend unabhängig vom untersuchten Fragment-Größenbereich ist (Löbrich *et al.* 1995; Pinto *et al.* 2005). Die vorliegende Arbeit erzielt nach Röntgenbestrahlung das gleiche Ergebnis. So sind in allen drei untersuchten Fragment-Größenbereichen 24 h nach Bestrahlung mehr als 95% der generierten Fragmente beseitigt worden (Abb. 3.19A). Wird diese Unabhängigkeit der DSB-Reparatur von der Größe der erzeugten Fragmente nach Röntgenbestrahlungen auf inter-Track-Fragmente übertragen, ist zu erwarten, dass die Reparatur ebenfalls

unabhängig von der Größe der generierten inter-Track-Fragmente ist. Um dies zu untersuchen, ist es notwendig, dass in allen Größenbereichen hauptsächlich inter-Track-Fragmente generiert werden. Dies ist durch die Bestrahlung mit einer hinreichend hohen Dosis erreicht worden (Abb. 3.20B). Die Reparatur von inter-Track-Fragmenten nach dieser hohen Dosis unterscheidet sich kaum von Fragment-Größenbereich zu Fragment-Größenbereich. Beispielsweise verbleiben 24 h nach Bestrahlung mit ^{124}Sn -Ionen bzw. ^{132}Xe -Ionen ca. 55% der generierten Fragmente im Größenbereich von 1050 kbp - 3130 kbp. Im Größenbereich von 48 kbp bis 240 kbp verbleiben immerhin etwa nach 40%. Dass die Reparatur im kleineren Größenbereich um 15% besser ist kann darauf zurückgeführt werden, dass trotz der hohen Initialdosis immer noch intra-Track-Fragmente generiert werden. Die Reparatur dieser Fragmentklasse kann anderen Bedingungen unterliegen und wird im Nachfolgenden diskutiert.

Zusammengefasst kann aus den Reparaturkinetiken von inter-Track-Fragmenten folgendes gefolgert werden: Der LET der Strahlenart und somit die Komplexität der einzelnen Brüche (überwiegender Anteil durch indirekten Strahleneffekte) übt einen entscheidenden Einfluss auf die Reparatur der induzierten DNA-DSBs aus: Je komplizierter ein Bruch ist, desto länger dauert dessen Reparatur. Weiter ist die Reparatur dieser DNA-DSBs unabhängig von der Länge der generierten Fragmente und unabhängig von der applizierten Dosis.

Die Bildung von intra-Track-Fragmenten unterliegt, im Gegensatz zur Bildung von inter-Track-Fragmenten, einem stärkeren Einfluss der Chromatinstruktur. Um den Einfluss dieser Chromatinstruktur auf die Reparatur von DNA-DSBs herausfinden zu können, muss die Reparatur von inter- mit der Reparatur von intra-Track-Fragmenten verglichen werden.

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Reparaturkinetiken nach Bestrahlungen mit niedrigen Initialdosen, bei welchen sich inter- und intra-Track-Fragmente noch nicht überlagern (Abb. 3.20A), zeigen, dass im Fragment-Größenbereiche, in dem keine höher geordnete Chromatinstruktur nachgewiesen werden konnte (1050 kbp - 3130 kbp), die DSB-Reparatur deutlich langsamer abläuft als in Größenbereichen, in denen intra-Track-Fragmente detektiert worden sind (48 kbp bis 240 kbp). So sinkt beispielsweise der Anteil an unreparierten DNA-DSBs 24 h nach der Bestrahlung mit ^{12}C -Ionen (187 Gy; 167 keV/ μm) von 20% (inter-Track-Fragmente) auf 7% (intra-Track-Fragmente) oder nach Bestrahlung mit ^{124}Sn - bzw. ^{132}Xe -Ionen von 55% auf 9%. Diese Abhängigkeit der DSB-Reparatur von der Größe der generierten Fragmente stimmt mit Veröffentlichungen überein, in denen große dsDNA-Fragmente (> 1 Mbp) eine langsamere Reparaturkinetik

aufweisen als kleinere dsDNA-Fragmente. So verbleiben 20 h nach Bestrahlung mit ^{14}N -Ionen (100 Gy; 175 keV/ μm) im Fragmentbereich von 1110 kbp bis 3500 kbp ca. 20% und im Bereich von 145 kbp bis 225 kbp ca. 8% der generierten Fragmente unrepariert (Stenerlöw *et al.* 1999; Stenerlöw *et al.* 2000; Höglund und Stenerlöw 2001; Stenerlöw und Höglund 2002). Unter der Voraussetzung, dass zwischen der Komplexität der induzierten DNA-DSBs von inter- und intra-Track-Fragmenten kein Unterschied besteht, bedeutet dies, dass die Reparatur von intra-Track-Fragmenten schneller abläuft als die Reparatur von inter-Track-Fragmenten. Inwiefern diese schnellere Reparatur auf die Chromatinstruktur zurückzuführen ist oder ob die räumliche Nähe der zwei DNA-DSBs eines dsDNA-Fragmentes eine Rolle spielt, ist anhand unterschiedlich dicht ionisierender Strahlungen untersucht worden.

Ein Vergleich der DSB-Reparaturkinetiken nach niedrigen Initialdosen der unterschiedlichen Strahlenarten im Fragment-Größenbereich von 48 kbp bis 240 kbp (intra-Track-Fragmente) zeigt, dass die Reparatur nahezu unabhängig vom LET der Strahlung ist. So sind trotz einer Variation des LET von 167 keV/ μm auf bis zu 8800 keV/ μm 24 h nach Bestrahlung lediglich 7% bis 12% der erzeugten intra-Track-Fragmente noch nicht repariert (Abb. 3.20A). Dies entspricht den durch Stenerlöw *et al.* (2000) ver  ffentlichten Daten. Hierbei verblieben im Fragmentbereich von 145 kbp bis 225 kbp nach Bestrahlung mit ^{14}N -Ionen (80 keV/ μm bis 225 keV/ μm) 4% bis 9% der induzierten DNA-DSBs. Dass nach Bestrahlungen mit unterschiedlich dicht ionisierenden Teilchen die Reparatur von DNA-DSBs von intra-Track-Fragmenten nahezu gleich ist, führt zu zwei Schlussfolgerungen. Zum einen ist die Reparatur intra-Track-Fragmenten, im Gegensatz zur Reparatur von inter-Track-Fragmenten, unabhängig vom LET der Strahlung und somit unabhängig von der Komplexität der einzelnen Bruchstellen. Zum anderen wurden durch die Verwendung der verschiedenen Strahlenarten die Zellen mit unterschiedlichen Dosen bestrahlt (^{12}C -Ionen: 187 Gy; ^{132}Xe -Ionen: 585 Gy). Da beide Strahlenarten eine nahezu identische Reparaturkinetik besitzen, folgt daraus, dass die Reparatur von DNA-DSBs von intra-Track-Fragmenten Dosis-unabhängig ist.

Da mit Zunahme des LET entlang einer Teilchenbahn mehr DNA-DSBs induziert werden, die Reparatur von, auf diesen DNA-DSBs beruhenden, intra-Track-Fragmente aber Dosis-unabhängig ist, ist demnach die Reparatur von intra-Track-Fragmenten auch unabhängig von der Dichte der DNA-DSBs entlang einer Teilchenbahn. Das heißt, die räumliche Nähe weiterer DNA-DSBs ist für die Reparatur eines einzelnen DNA-DSBs nicht ausschlaggebend. Vielmehr scheint es so, als ob jeder Reparaturvorgang ein einzelnes unabhängiges Ereignis darstellt.

Interessanterweise ist eine Abhängigkeit der DSB-Reparatur vom LET der Strahlung auch im Größenbereich der primären und sekundären Chromatinstruktur beobachtet worden (0,1 kbp – 2 kbp). So bleiben 20 h nach einer 80 Gy - Bestrahlung 7% bis 18% der induzierten DNA-DSBs unrepariert (^4He 60 keV/ μm ; ^4He 97 keV/ μm ; ^{26}Fe 150 keV/ μm (Rydberg *et al.* 1998b).

Zusammengefasst kann aus den Reparaturkinetiken von intra-Track-Fragmenten folgendes gefolgert werden: Die Reparatur der DNA-DSBs von intra-Track-Fragmenten ist unabhängig von der applizierten Dosis und jeder DNA-DSB stellt ein einzelnes unabhängiges Ereignis dar. Der LET der Strahlenart und somit die Komplexität der einzelnen Brüche (zunehmender Anteil an direkten Strahleneffekten) übt keinen entscheidenden Einfluss auf die Reparatur der induzierten DNA-DSBs aus. Intra-Track-Fragmente werden schneller wieder verbunden als inter-Track-Fragmente. Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass eine biologische Komponente eine freie Diffusion der Enden des Bruches verhindert.

4.2.2 DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur nach Röntgen- und α -Teilchen-Niedrigdosis-Bestrahlungen

Neben der Methode der PFGE, bei der die Induktion von DNA-DSBs über die durch ionisierende Strahlungen generierten dsDNA-Fragmente gemessen wird, kann die Induktion von DNA-DSBs auch durch Fluoreszenzmarkierung verschiedener DSB-Reparaturkomponenten gemessen werden. Durch diese Technik ist es möglich die Induktion und Reparatur einzelner DNA-DSBs zu verfolgen. In der vorliegenden Arbeit wurde hierbei die Phosphorylierung des Histons H2AX bzw. die Dephosphorylierung von γ -H2AX verfolgt. Die Phosphorylierung dieses Histons, welche bis zu einer Entfernung von ca. 2 Mbp von der Bruchstelle vorgenommen wird, ist eine frühe DNA-Schadensantwort (etwa 3 min) der bestrahlten Zellen (Rogakou *et al.* 1998; Rogakou *et al.* 2000; Foster und Downs 2005).

In dieser Arbeit sind MRC-5 Zellen als konfluenten Zellmonolayer bestrahlt worden. In diesem konfluenten Zustand befinden sich ca. 98% der Zellen in der G_0/G_1 -Phase des Zellzyklus. Daher kann davon ausgegangen werden, dass der Phosphorylierung von H2AX die Induktion eines DNA-DSBs vorausgeht, somit beruht jeder im Fluoreszenzmikroskop detektierbare γ -H2AX Fokus auf mindestens einem DNA-DSB (Rogakou *et al.* 1999; Rothkamm und Löbrich 2003).

Die dünn ionisierende Röntgenstrahlung induziert DNA-DSBs stochastisch verteilt, so dass in der Regel ein Fokus exakt einen DNA-DSB widerspiegelt. Eine Ausnahme hierbei sind Brüche, die sich innerhalb einer Distanz von bis zu 2 Mbp zueinander befinden, da diese fluoreszenztechnisch nicht getrennt auflösbar sind. Die dicht ionisierende α -Strahlung induziert DNA-DSBs entlang der Bahn der α -Teilchen. Dadurch ist es möglich, dass mehrere übereinander liegende DNA-DSBs nur einen detektierbaren Fokus ergeben. Werden die mittels direkter DSB-Quantifizierung ermittelten Induktionsraten dieser Arbeit zugrunde gelegt, so besteht nach einer kollimierten α -Bestrahlung ein Fokus im Mittel 7,5 DNA-DSBs (Tab. 3.4).

Das heißt, wenn ein einzelnes α -Teilchen den Zellkern durchquert, werden im Mittel 7,5 DNA-DSBs induziert. Um im Mittel 7,5 DNA-DSBs pro Zellkern durch die hier benutzte kollimierte α -Strahlung zu induzieren ($\hat{=}$ einer Fluenz von 1 Teilchen pro Zellkern), muss in diesem eine Dosis von 93 mGy deponiert werden. Wird hingegen Röntgenstrahlung (90keV) verwendet, muss eine Dosis von 210 mGy appliziert werden, damit im Mittel pro Zellkern 7,5 γ -H2AX Foci ($\hat{=}$ 7,5 DNA-DSBs) detektierbar sind. (Zum Vergleich: Bei einer Thorax-Abdomen-Computer-Tomographie (Dosislängenprodukt von 1000 Gy*cm) wird eine Dosis von 20 mGy appliziert (Löbrich *et al.* 2005)).

Neben der Induktion von DNA-DSBs durch dünn und dicht ionisierende Strahlenarten wird ein Spektrum weiterer DNA-Schäden induziert, wie Einzelstrangbrüche, Basenschäden oder Veränderungen am Zuckerphosphatgerüst. Erfolgt eine homogene Bestrahlung der zellulären Monolayer durch Röntgenstrahlung, treten prinzipiell in jeder einzelnen Zelle diese DNA-Schädigungen auf. Im Vergleich hierzu führt eine Bestrahlung mit einer niedrigen Fluenz α -Teilchen (< 1 Teilchen pro Zellkern) dazu, dass primär nur die Zellen einen Schaden erleiden, welche von einem Teilchen getroffen worden sind. In Zellen, welche nicht getroffen wurden, wird durch den direkten Strahleneffekt kein Schaden induziert. Durch Bystander-Effekte ist jedoch eine Induzierung von DNA-Läsionen auch in diesen nicht getroffenen Zellen möglich.

Demnach ist durch die Verwendung der unterschiedlichen Strahlenarten in eingeschränktem Maße die Möglichkeit gegeben die Einleitung der Reparatur von DNA-DSBs in Abhängigkeit von der applizierten Dosis zu untersuchen (der Existenz einer Schwellendosis).

Bisher konnte gezeigt werden, dass nach Bestrahlung mit sehr niedrigen Dosen Röntgenstrahlung (1,2 mGy) DNA-DSBs über einen längeren Zeitraum persistieren können (> 14 Tage). Bei höheren Dosen Röntgenstrahlung (> 20 mGy $\hat{=}$ > 1 DNA-DSBs/Zellkern) setzt hingegen eine deutlich sichtbare Reparatur ein (Rothkamm und

Löbrich 2003). Gleiches gilt für die in dieser Arbeit gezeigten Daten, so persistieren alle DNA-DSBs nach einer Dosis von 2 mGy und 5 mGy über mindestens 24 h. Bei Initialdosen von 50 mGy und 200 mGy Röntgenstrahlen ist, wie in Rothkamm und Löbrich (2003) beschrieben, ebenfalls eine deutlich sichtbare Reparatur beobachtbar (Abb. 3.23). Demnach scheint es so, dass zur Einleitung der DSB-Reparatur zunächst ein Level der DNA-Schädigung überschritten werden muss. Der Level kann dabei von zwei Faktoren abhängen. Zum einen kann der Schaden innerhalb einer Zelle für die Einleitung der DSB-Reparatur ausschlaggebend sein. Zum andern ist es auch möglich, dass für die Initiierung der DSB-Reparatur eine Schädigung der benachbarten Zellen notwendig ist, welche über *gap junctions* oder über ins Kulturmedium abgegebene Signalfaktoren mit der ebenfalls geschädigten Zelle interagieren.

Um dies zu untersuchen, kann die, im Vergleich zu Röntgenstrahlung, lokale Induktion von DNA-Schäden durch α -Strahlung genutzt werden. So zeigt sich, dass die DSB-Reparatur nach kollimierter α -Teilchen Bestrahlung bereits bei einer Fluenz eingeleitet ist, bei der ca. jede zehnte Zelle (9 mGy) einen Teilchendurchgang erfahren hat. Die Dephosphorylierung von γ -H2AX und somit das Verschwinden des Fokus wird jedoch erst nach 4 h bis 8 h beobachtet (Abb. 3.23). Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass zunächst alle DNA-DSBs innerhalb der Teilchenbahn repariert sein müssen, bevor das Fluoreszenzsignal verschwinden kann. Bei einer unkollimierten α -Teilchen Bestrahlung wird zwar pro Teilchen eine ähnliche Energiemenge deponiert (114 mGy), da die Teilchen auch schräg durch den Zellkern fliegen können, liegen die induzierten DNA-DSBs nicht Dringenderweise übereinander. So ist es, wie beobachtet, möglich, dass ein Verschwinden der γ -H2AX Foci zu früheren Reparaturzeitpunkten einsetzt. Diese zeitige Dephosphorylierung beruht auf „allein stehenden“ DNA-DSBs. Da durch α -Strahlung in benachbarten Zellen keine direkten DNA-Schäden induziert werden (auch bei unkollimierter Bestrahlung sehr unwahrscheinlich), die getroffene Zelle die induzierten DNA-DSBs trotzdem repariert, scheint die DSB-Reparatur von jeder Zelle individuell eingeleitet zu werden. Damit ist der Level der Schädigung innerhalb einer Zelle für die Initiierung der DSB-Reparatur ausschlaggebend.

Für die Betrachtung von biologischen Endpunkten wie genomischer Instabilität, Mutationen oder Apoptose lassen sich aus den dargestellten Daten folgende Schlussfolgerungen ziehen. Offensichtlich kommen im Niedrigdosisbereich (Induktion von weniger als 1 DNA-DSB/Zellkern) andere biologische Mechanismen zur Beseitigung der induzierten DNA-Läsionen zum Tragen. Diese könnten beispielsweise in einer Entfernung der geschädigten Zelle oder der Inhibierung der Teilungsfähigkeit, z.B. durch

einen permanenten Zellzyklusarrest, bestehen (Rothkamm und Löbrich 2003). In beiden Fällen wird durch diese „Nicht-Reparatur“ das Risiko einer fehlerbehafteten DSB-Reparatur ausgeschlossen bzw. minimiert.

Bei Bestrahlungen mit Teilchenstrahlungen scheint hingegen immer ein DSB-Reparaturmechanismus einzusetzen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass selbst der Durchgang eines einzelnen α -Teilchens etwa über dem fünffachen der Dosis liegt (93 mGy), die zur Initiierung der DSB-Reparatur nach Röntgenbestrahlung notwendig ist (20 mGy). Demzufolge wird jede durch ein α -Teilchen getroffene Zelle die DSB-Reparatur einleiten. Nach Röntgenbestrahlungen, kann es hingegen sein, dass die Brüche überhaupt nicht repariert werden und somit auch nicht falsch verbunden werden können. Da nach Teilchen-Bestrahlungen die DSB-Reparatur immer eingeleitet wird, wächst somit die Wahrscheinlichkeit einer Fehlreparatur. Erschwerend kommt hinzu, dass mit steigendem LET die Bruch-Enden immer komplexer werden, wodurch das Risiko einer Fehlreparatur zusätzlich erhöht wird. Dadurch kann unter anderem das erhöhte karzinogene Potential von α -Strahlung gegenüber Röntgenstrahlung erklärt werden.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die Organisation höher geordneter Chromatinstrukturen zu untersuchen um deren Bedeutung für die strahlenbiologische Wirkung von Teilchenstrahlen zu beurteilen. Hierzu wurde die Induktion und Reparatur räumlich korrelierter DNA-DSBs in lebenden Säugerzellen nach hoch-LET-Bestrahlung untersucht. Aus den gemessenen Größenverteilungen der strahleninduzierten DNA-Fragmentierung konnten anschließend Rückschlüsse auf tertiäre Chromatinstruktur gezogen werden.

Hoch-LET Teilchen erzeugen entlang ihrer Bahnspur eine Vielzahl an Ionisationen, die zu korrelierten DNA-DSBs führen. Die Verteilungen der entstehenden dsDNA-Fragmente sind sowohl von den physikalischen Eigenschaften der benutzten Strahlenart als auch von der 3D-Struktur des Chromatins abhängig. Chromatinbereiche, die durch die Chromatinorganisation nahe beieinander liegen, besitzen eine höhere Wahrscheinlichkeit durch ein einzelnes Teilchen gleichzeitig einen DNA-DSB zu erhalten als Bereiche, welche räumlich weit voneinander entfernt liegen. Unter Ausnutzung dieser strukturell bedingten Induktion von DNA-DSBs wurden die durch die Strahlung generierten dsDNA-Fragmentverteilungen unter Berücksichtigung der Strahlenqualität, des Kondensationsgrades des Chromatins und des Einflusses der Transkriptionsaktivität der DNA untersucht. Aus den durchgeführten Analysen konnten so Rückschlüsse auf die Größe der tertiären Chromatinstruktur und auf deren Einfluss auf die Generierung der dsDNA-Fragmente gezogen werden.

Die qualitative Analyse beschreibt das Verhalten der Maxima der gemessenen Fragmentverteilungen in Abhängigkeit von der Fluenz. Sie ermöglicht es in primären menschlichen Fibroblasten in der G_0/G_1 -Phase des Zellzyklus zwischen inter- und intra-Track Fragmenten zu unterscheiden. Inter-Track-Fragmente werden durch zwei Teilchenspuren erzeugt, sind LET abhängig und verschieben sich mit Zunahme der Fluenz zu kleinerem Molekulargewicht hin. Intra-Track-Fragmente beruhen auf einer einzelnen Teilchenspur, sind LET unabhängig und zeigen keine Abhängigkeit des Molekulargewichts von der Fluenz. Das konstante Maximum der gemessenen Fragmentverteilungen der intra-Track-Fragmente liegt bei ca. 500 kbp. Die Unabhängigkeit der intra-Track-Fragmente von den physikalischen Eigenschaften der unterschiedlichen Strahlenarten deutet darauf hin, dass eine biologische Struktur für die überproportionale Generierung dieser ca. 500 kbp großen dsDNA-Fragmenten verantwortlich ist. Die quantitative Analyse beruht auf der Ermittlung der DSB-

Induktionsraten, mittels dem *Random-Breakage* Modell, in spezifischen Fragment-Größenbereichen. Bei einer rein stochastischen Fragmentverteilung sollte die Induktionsrate unabhängig vom betrachteten Größenbereich sein. Es wird jedoch eine deutliche Abhängigkeit der Induktionsrate von der Fragmentgröße nach Bestrahlung mit hoch-LET Teilchen festgestellt. Unterhalb 500 kbp wird eine signifikante Erhöhung der Induktionsrate beobachtet. Dieser Anstieg tritt bei allen benutzten Strahlenarten im gleichen Größenbereich auf. Daher scheinen die physikalischen Eigenschaften ionisierender Strahlung in diesem Bereich nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Vielmehr deutet dieses (nicht stochastische) Verhalten ebenso auf eine biologische Struktur hin. Das ist mit der qualitativen Analyse konsistent, da hier eine Fragmentart, die intra-Track-Fragmente, gefunden wurde, deren Generierung (Größe) ebenfalls unabhängig von den physikalischen Eigenschaften der verschiedenen Strahlenarten ist. Aus beiden Analysen lässt sich daher schlussfolgern, dass in G_0/G_1 -Zellen eine höher geordnete Chromatinstruktur mit einer typischen Größe von ca. 500 kbp existiert.

Neben G_0/G_1 -Zellen wurde die Organisation der höher geordneten Chromatinstruktur weiter dahingehend untersucht, inwieweit diese sich im Verlauf des Zellzyklus verändert. Darüber hinaus sind, durch die Verwendung regionenspezifischer DNA-Sonden, dsDNA-Fragmentverteilungen in Genomregionen mit hetero- und euchromatischem Charakter gemessen worden. Die erhaltenen Verteilungen im betrachteten Größenbereich von 48 kbp bis 3 Mbp zeigen, dass die Variation des Kondensationsgrades des Chromatins über den Zellzyklus und die unterschiedliche Transkriptionsaktivität der DNA innerhalb des Genoms keinen Einfluss auf die Generierung von dsDNA-Fragmenten ausüben. Da die Erzeugung von intra-Track-Fragmenten jedoch von einer biologischen Komponente beeinflusst ist, der tertiären Chromatinstruktur, deutet dies darauf hin, dass diese tertiäre Struktur im gesamten menschlichen Genom „universal“ ist. Diese „universale“ Struktur wird am besten durch das *multi-loop subcompartment* Modell beschrieben, dass eine Organisation der DNA in Schleifen von bis zu 1 Mbp beschreibt, welche wiederum unterstrukturiert sein können.

Um die Bedeutung der Chromatinstruktur für die strahlenbiologische Wirkung von hoch-LET Strahlung beurteilen zu können, wurde die Reparatur von DNA-DSBs im gesamten Genom betrachtet. Mit dem gewählten Ansatz war es möglich, die Reparatur nach Teilchenbestrahlung zu untersuchen und dabei zwischen erzeugten inter- und intra-Track-Fragmenten zu unterscheiden. Da letztere auf die Bahnspur eines einzelnen Teilchens zurückgeführt werden können, sind hiermit Rückschlüsse auf das Reparaturverhalten nach einem einzigen Teilchendurchgang durch den Zellkern möglich.

Aus Reparaturstudien zu inter-Track-Fragmenten geht hervor, dass mit steigendem LET, und damit der zunehmenden Komplexität der einzelnen Brüche, eine verlangsamte DSB-Reparatur stattfindet. Des Weiteren konnte durch einen Vergleich der Reparaturkinetiken von inter- mit intra-Track-Fragmenten gezeigt werden, dass die Chromatinorganisation zu einer schnelleren Reparatur von DNA-DSBs beitragen kann. Diese schnellere Reparatur kann durch eine eventuelle Verhinderung der Diffusion der freien DNA-Enden des Bruches ermöglicht werden. Die Reparatur der einzelnen DNA-DSBs innerhalb einer Teilchenbahn scheint dabei weitestgehend unabhängig von deren räumlichen Nähe zueinander zu sein.

In einem weiteren Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Induktion und Reparatur von DNA-DSBs nach Röntgen und α -Teilchen-Niedrigdosis-Bestrahlungen untersucht. Durch die Verwendung sehr niedriger Dosen und zweier unterschiedlicher Strahlenarten sollte herausgefunden werden, ob die „Initiierung“ der Reparatur vom Schadenslevel der einzelnen geschädigten Zelle abhängt oder ob eine Schädigung weiterer benachbarter Zellen notwendig ist. Durch eine Fluoreszenzmarkierung von γ -H2AX konnten einzelne DNA-DSBs durch eine manuelle Auszählung am Mikroskop direkt gemessen werden. Die gezählten γ -H2AX Foci stiegen hierbei für jede verwendete Strahlung linear mit der Dosis an. Die Reparatur der induzierten DNA-DSBs wird durch das Verschwinden der γ -H2AX Foci gemessen. Nach Niedrigdosis-Röntgenbestrahlung setzt eine beobachtbare Reparatur erst ab einer Schwellendosis ein, bei der im Mittel in jeder Zelle ein DNA-DSB induziert wurde (ca. 20 mGy). Erfolgt hingegen eine Bestrahlung mit niedrigeren Dosen, können die induzierten DNA-DSBs über einen Zeitraum von mindestens 14 Tagen persistieren. Nach α -Teilchen-Niedrigdosis-Bestrahlungen wird in der geschädigten Zelle die DSB-Reparatur selbst beim Durchgang eines einzelnen Teilchens durch den Zellkern eingeleitet. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass der Level der Schädigung innerhalb dieser einzelnen Zelle für die „Initiierung“ der Reparatur entscheidend ist und nicht der Schädigung weiterer benachbarter Zellen bedarf. Der Level wird jedoch selbst beim Durchgang eines einzigen α -Teilchens durch den Zellkern überschritten.

6. Literaturverzeichnis

- Abraham, R. T.** 2003. Checkpoint signaling: epigenetic events sound the DNA strand-breaks alarm to the ATM protein kinase. *Bioessays* **25**: 627-630.
- Adam, M., F. Robert, M. Larochelle und L. Gaudreau.** 2001. H2A.Z is required for global chromatin integrity and for recruitment of RNA polymerase II under specific conditions. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 6270-6279.
- Ahnström, G., J. Nygren und S. Eriksson.** 2000. The effect of dimethyl sulphoxide on the induction and repair of double-strand breaks in human cells after irradiation with gamma-rays and accelerated ions: rapid or slow repair may depend on accessibility of breaks in chromatin of different compactness. *Int. J. Radiat. Biol.* **76**: 533-538.
- Azzam, E. I., S. M. de Toledo, T. Gooding und J. B. Little.** 1998. Intercellular communication is involved in the bystander regulation of gene expression in human cells exposed to very low fluences of alpha particles. *Radiat. Res.* **150**: 497-504.
- Azzam, E. I., S. M. de Toledo und J. B. Little.** 2001. Direct evidence for the participation of gap junction-mediated intercellular communication in the transmission of damage signals from alpha-particle irradiated to nonirradiated cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 473-478.
- Azzam, E. I., S. M. de Toledo und J. B. Little.** 2003. Oxidative metabolism, gap junctions and the ionizing radiation-induced bystander effect. *Oncogene* **22**: 7050-7057.
- Azzam, E. I. und J. B. Little.** 2004. The radiation-induced bystander effect: evidence and significance. *Human & Experimental Toxicology* **23**: 61-65.
- Beadle, G. W. und E. L. Tatum.** 1941. Genetic Control of Biochemical Reactions in Neurospora. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **27**: 499-506.
- Bedford, J. S. und W. C. Dewey.** 2002. Historical and current highlights in radiation biology: Has anything important been learned by irradiating cells? *Radiat. Res.* **158**: 251-291.
- Bednar, J., R. A. Horowitz, S. A. Grigoryev, L. M. Carruthers, J. C. Hansen, A. J. Koster und C. L. Woodcock.** 1998. Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 14173-14178.
- Belli, M., A. Campa, V. Dini, G. Esposito, Y. Furusawa, G. Simone, E. Sorrentino und M. A. Tabocchini.** 2006. DNA fragmentation induced in human fibroblasts by accelerated Fe-56 ions of differing energies. *Radiat. Res.* **165**: 713-720.
- Belmont, A. S. und K. Bruce.** 1994. Visualization of G1 chromosomes: a folded, twisted, supercoiled chromonema model of interphase chromatid structure. *J. Cell Biol.* **127**: 287-302.

- Belyakov, O. V., K. M. Prise, K. R. Trott und B. D. Michael.** 1999. Delayed lethality, apoptosis and micronucleus formation in human fibroblasts irradiated with X-rays or alpha-particles. *Int. J. Radiat. Biol.* **75**: 985-993.
- Belyakov, O. V., M. Folkard, C. Mothersill, K. M. Prise und B. D. Michael.** 2000. Bystander effect and genomic instability. Challenging the classic paradigm of radiobiology. **VI**, ed. *Modern problems of radiobiology, radioecology, and evolution*. 80-90. JINR. Proceedings of the International Conference dedicated to the centenary of the birth of N.W. Timofeeff-Ressovsky Dubna (Russia).
- Belyakov, O. V., A. M. Malcolmson, M. Folkard, K. M. Prise und B. D. Michael.** 2001. Direct evidence for a bystander effect of ionizing radiation in primary human fibroblasts. *British J. of Cancer* **84**: 674-679.
- Belyakov, O. V., M. Folkard, C. Mothersill, K. M. Prise und B. D. Michael.** 2006. Bystander-induced differentiation: a major response to targeted irradiation of a urothelial explant model. *Mutat. Res.* **597**: 43-49.
- Berkovich, E., R. J. Monnat, Jr. und M. B. Kastan.** 2007. Roles of ATM and NBS1 in chromatin structure modulation and DNA double-strand break repair. *Nature Cell Biol.* **9**: 683-690.
- Bethe, H.** 1930. Zur Theorie des Durchgangs schneller Korpuskularstrahlen durch Materie. *Ann. d. Physik* **5**: 325.
- Bethe, H.** 1932. Bremsformel für Elektronen relativistischer Geschwindigkeit. *Phys.* **76**: 293.
- Blöcher, D., M. Einspenner und J. Zajackowski.** 1989. CHEF electrophoresis, a sensitive technique for the determination of DNA double-strand breaks. *Int. J. Radiat. Biol.* **56**: 437-448.
- Blöcher, D.** 1990. In CHEF electrophoresis a linear induction of dsb corresponds to a nonlinear fraction of extracted DNA with dose. *Int. J. Radiat. Biol.* **57**: 7-12.
- Bowater, R. und A. J. Doherty.** 2006. Making ends meet: repairing breaks in bacterial DNA by non-homologous end-joining. *PLoS. Genet.* **2(2)**: e8.
- Burdak-Rothkamm, S., S. C. Short, M. Folkard, K. Rothkamm und K. M. Prise.** 2007. ATR-dependent radiation-induced gamma H2AX foci in bystander primary human astrocytes and glioma cells. *Oncogene* **26**: 993-1002.
- Bustin, M.** 2001. Chromatin unfolding and activation by HMGN chromosomal proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **26**: 431-437.
- Carle, G. F. und M. V. Olson.** 1987. Orthogonal-field-alternation gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* **155**: 468-482.
- Carruthers, L. M., J. Bednar, C. L. Woodcock und J. C. Hansen.** 1998. Linker histones stabilize the intrinsic salt-dependent folding of nucleosomal arrays: Mechanistic ramifications for higher-order chromatin folding. *Biochemistry* **37**: 14776-14787.

- Carruthers, L. M. und J. C. Hansen.** 2000. The core histone N termini function independently of linker histones during chromatin condensation. *J. Biol. Chem.* **275**: 37285-37290.
- Chapman, E. D., A. Reuvers, J. Borsa und C. L. Greenstock.** 1973. Chemical radioprotection and the implications in DNA double-strand break repair. *Radiat. Res.* **56**: 291-306.
- Chatterjee, A. und W. R. Holley.** 1991. Energy Deposition Mechanisms and Biochemical Aspects of DNA Strand Breaks by Ionizing Radiation. *Int. J. Quant. Chem.* **39**: 709-727.
- Chatterjee, A. und W. R. Holley.** 1993. Computer Simulation of Initial Events in the Biochemical Mechanisms of DNA Damage, p. 181-226. In J. T. Lett and W. K. Sinclair (ed.), *Advances in Radiation Biology*, vol. 17. *ACADEMIC PRESS*, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto.
- Chaudhry, M. A.** 2006. Bystander effect: biological endpoints and microarray analysis. *Mutat. Res.* **597**: 98-112.
- Christmann, M., M. T. Tomicic, W. P. Roos und B. Kaina.** 2003. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* **193**: 3-34.
- Claesson, A. K., B. Stenerlöv, L. Jacobsson und K. Elmroth.** 2007. Relative Biological Effectiveness of the alpha-Particle Emitter (211)At for Double-Strand Break Induction in Human Fibroblasts. *Radiat. Res.* **167**: 312-318.
- Clarkson, M. J., J. R. E. Wells, F. Gibson, R. Saint und D. J. Tremethick.** 1999. Regions of variant histone His2AvD required for Drosophila development. *Nature*. **399**: 694-697.
- Coates, P. J., S. A. Lorimore und E. G. Wright.** 2004. Damaging and protective cell signalling in the untargeted effects of ionizing radiation. *Mutat. Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **568**: 5-20.
- Contopoulou, C. R., V. E. Cook und R. K. Mortimer.** 1987. Analysis of DNA double strand breakage and repair using orthogonal field alternation gel electrophoresis. *Yeast* **3**: 71-76.
- Corry, P. M. und A. Cole.** 1973. Double Strand Rejoining in Mammalian DNA. *Nature New Biol.* **245**: 100-101.
- Cremer, M., J. von Hase, T. Volm, A. Brero, G. Kreth, J. Walter, C. Fischer, I. Solovei, C. Cremer und T. Cremer.** 2001. Non-random radial higher-order chromatin arrangements in nuclei of diploid human cells. *Chromosome Res.* **9**: 541-567.
- Cremer, T., G. Kreth, H. Koester, R. H. A. Fink, R. Heintzmann, M. Cremer, I. Solovei, D. Zink, und C. Cremer.** 2000. Chromosome territories, interchromatin domain compartment, and nuclear matrix: An integrated view of the functional nuclear architecture. *Crit. Rev. Eukar. Gene Expr.* **10**: 179-212.
- Cremer, T. und C. Cremer.** 2001. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nature Rev. Genet.* **2**:292-301.

- Crissman, H. A., M. S. Oka und J. A. Steinkamp.** 1976. Rapid Staining Methods for Analysis of Deoxyribonucleic-Acid and Protein in Mammalian-Cells. *J. Histochem. & Cytochem.* **24**: 64-71.
- Crissman, H. A. und J. A. Steinkamp.** 1982. Rapid, One-Step Staining Procedures for Analysis of Cellular Dna and Protein by Single and Dual Laser Flow-Cytometry. *Cytometry* **3**: 84-90.
- Cui, Y. und C. Bustamante.** 2000. Pulling a single chromatin fiber reveals the forces that maintain its higher-order structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 127-132.
- Dahm-Daphi, J. und E. Dikomey.** 1996. Rejoining of DNA double-strand breaks in X-irradiated CHO cells studied by cons. *Int. J. Radiat. Biol.* **69**: 615-621.
- De, D. N.** 2002. Protein constitution of the chromosome axis. *Chromosoma* **111**:69-79.
- Deckbar, D., J. Birraux, A. Krempler, L. Tchouandong, A. Beucher, S. Walker, T. Stiff, P. Jeggo und M. Löbrich.** 2007. Chromosome breakage after G2 checkpoint release. *J. Cell Biol.* **176**: 749-755.
- Deshpande, A., E. H. Goodwin, S. M. Bailey, B. L. Marrone und B. E. Lehnert.** 1996. Alpha-particle-induced sister chromatid exchange in normal human lung fibroblasts: Evidence for an extranuclear target. *Radiat. Res.* **145**: 260-267.
- DuPraw, E. J.** 1965. Macromolecular organization of nuclei and chromosomes: a folded fibre model based on whole-mount electron microscopy. *Nature.* **206**: 338-343.
- DuPraw, E. J.** 1970. DNA & Chromosoms. Holt, Rinehart, & Winston, New York .
- Elia, M. C. und W. W. Nichols.** 1993. Application of programmable, autonomously controlled electrode (PACE) technology to the development of an improved pulsed field gel electrophoresis assay for DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **63**: 7-11.
- Engels, W. R., D. Johnson-Schlitz, C. Flores, L. White und C. R. Preston.** 2007. A third link connecting aging with double strand break repair. *Cell Cycle* **6**: 131-135.
- Evans, R.** 1968. X-ray and γ -ray interactions. *Radiat. Dosimetry I.*
- Fan, J. Y., F. Gordon, K. Luger, J. C. Hansen und D. J. Tremethick.** 2002. The essential histone variant H2A.Z regulates the equilibrium between different chromatin conformational states. *Nature Struct. Biol.* **9**: 172-176.
- Ferreira, J., G. Paoletta, C. Ramos und A. I. Lamond.** 1997. Spatial organization of large-scale chromatin domains in the nucleus: a magnified view of single chromosome territories. *J. Cell Biol.* **139**: 1597-1610.
- Finch, J. T. und A. Klug.** 1976. Solenoid model for super structure in chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**: 1897-1901.
- Foster, E. R. und J. A. Downs.** 2005. Histone H2A phosphorylation in DNA double-strand break repair. *Febs. J.* **272**: 3231-3240.

- Fournier, C., D. Becker, M. Winter, P. Barberet, M. Heiss, B. Fischer, J. Topsch und G. Taucher-Scholz.** 2007. Cell cycle-related bystander responses are not increased with LET after heavy-ion irradiation. *Radiat. Res.* **167**: 194-206.
- Frankenberg, D., H. J. Brede, U. J. Schrewe, C. Steinmetz, M. Frankenberg-Schwager, G. Kasten und E. Pralle.** 1999. Induction of DNA double-strand breaks by ¹H and ⁴He ions in primary human skin fibroblasts in the LET range of 8 to 124 keV/microm. *Radiat. Res.* **151**: 540-549.
- Fricke, H. und E. J. Hart.** 1966. Chemical Dosimetry, p. 167-239. In W. C. R. Attix and (ed.), *Radiat. Dosimetry*. New York Academic Press.
- Friedberg, E. C.** 2003. DNA damage and repair. *Nature.* **421**: 436-440.
- Friedland, W., P. Jacob, H. G. Paretzke und T. Stork.** 1998. Monte Carlo simulation of the production of short DNA fragments by low- linear energy transfer radiation using higher-order DNA models. *Radiat. Res.* **150**: 170-182.
- Friedland, W., P. Jacob, H. G. Paretzke, M. Merzagora und A. Ottolenghi.** 1999. Simulation of DNA fragment distributions after irradiation with photons. *Radiat. Environ. Biophys.* **38**: 39-47.
- Gasser, S. und D. H. Raulet.** 2006. The DNA damage response arouses the immune system. *Cancer Res.* **66**: 3959-3962.
- Gauter, B., O. Zlobinskaya und K. J. Weber.** 2002. Rejoining of radiation-induced DNA double-strand breaks: pulsed-field electrophoresis analysis of fragment size distributions after incubation for repair. *Radiat. Res.* **157**: 721-733.
- Getzenberg, R. H., K. J. Pienta, W. S. Ward und D. S. Coffey.** 1991. Nuclear structure and the three-dimensional organization of DNA. *J. Cell Biochem.* **47**: 289-299.
- Gilbert, N. und J. Allan.** 2001. Distinctive higher-order chromatin structure at mammalian centromeres. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 11949-11954.
- Goodhead, D. T.** 1985. Saturable repair models of radiation action in mammalian cells. *Radiat. Res. Suppl* **8**: S58-S67.
- Goodhead, D. T.** 1994. Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *Int. J. Radiat. Biol.* **65**: 7-17.
- Green, G. R., R. R. Ferlita, W. F. Walkenhorst und D. L. Poccia.** 2001. Linker DNA destabilizes condensed chromatin. *Biochem. Cell Biol.* **79**: 349-363.
- Gunther, K. und W. Schulz.** 1983. Biophysical Theory of Radiation Action. *Akademie-Verlag*, Berlin, GDR.
- Hahnfeldt, P., J. E. Hearst, D. J. Brenner, R. K. Sachs und L. R. Hlatky.** 1993. Polymer models for interphase chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 7854-7858.
- Hall, E. J.** 2000. Radiobiology for the Radiologist. *Lippincott Williams & Wilkins*, Philadelphia, USA.

- Hattori, M., A. Fujiyama, T. D. Taylor, H. Watanabe, T. Yada, H. S. Park, A. Toyoda, K. Ishii, Y. Totoki, D. K. Choi, E. Soeda, M. Ohki, T. Takagi, Y. Sakaki, S. Taudien, K. Blechschmidt, A. Polley, U. Menzel, J. Delabar, K. Kumpf, R. Lehmann, D. Patterson, K. Reichwald, A. Rump, M. Schilhabel und A. Schudy.** 2000. The DNA sequence of human chromosome 21. The chromosome 21 mapping and sequencing consortium. *Nature*. **405**: 311-319.
- Hayflick, L. und P. S. Moorhead.** 1961. Serial Cultivation of Human Diploid Cell Strains. *Exp. Cell Res.* **25**: 585-621.
- Höglund, E., E. Blomquist, J. Carlsson und B. Stenerlöv.** 2000. DNA damage induced by radiation of different linear energy transfer: initial fragmentation. *Int. J. Radiat. Biol.* **76**: 539-547.
- Höglund, E. und B. Stenerlöv.** 2001. Induction and rejoining of DNA double-strand breaks in normal human skin fibroblasts after exposure to radiation of different linear energy transfer: possible roles of track structure and chromatin organization. *Radiat. Res.* **155**: 818-825.
- Holley, W. R. und A. Chatterjee.** 1996. Clusters of DNA induced by ionizing radiation: formation of short DNA fragments. I. Theoretical modeling. *Radiat. Res.* **145**: 188-199.
- Horn, P. J. und C. L. Peterson.** 2002. Chromatin Higher Order Folding: Wrapping up Transcription. *Science* **297**: 1824-1827.
- ICRP.** 2005 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection - 2005. International Commission on Radiological Protection; Publication. Draft for Consultation.
- Iyer, R. und B. E. Lehnert.** 2002a. Alpha-particle-induced increases in the radioresistance of normal human bystander cells. *Radiation Research* **157**:3-7.
- Iyer, R. und B. E. Lehnert.** 2002b. Low dose, low-LET ionizing radiation-induced radioadaptation and associated early responses in unirradiated cells. *Mutat. Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **503**: 1-9.
- Jackson, S. P.** 2002. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* **23**: 687-696.
- Jacobs, J. P., C. M. Jones und J. P. Baille.** 1970. Characteristics of A Human Diploid Cell Designated Mrc-5. *Nature*. **227**: 168-&.
- Jakob, B., M. Scholz und G. Taucher-Scholz.** 2003. Biological Imaging of Heavy Charged-Particle Tracks. *Radiat.Res.* **159**: 676-684.
- Janicki, S. M., T. Tsukamoto, S. E. Salghetti, W. P. Tansey, R. Sachidanandam, K. V. Prasanth, T. Ried, Y. Shav-Tal, E. Bertrand, R. H. Singer und D. L. Spector.** 2004. From silencing to gene expression: real-time analysis in single cells. *Cell*. **116**: 683-698.
- Jeggo, P. A. und M. Löbrich.** 2005. Artemis links ATM to double strand break rejoining. *Cell Cycle* **4**: 359-362.

- Kashino, G., K. Suzuki, N. Matsuda, S. Kodama, K. Ono, M. Watanabe und K. M. Prise.** 2007. Radiation induced bystander signals are independent of DNA damage and DNA repair capacity of the irradiated cells. *Mutat. Res.* **619**: 134-138.
- Kastan, M. B. und D. S. Lim.** 2000. The many substrates and functions of ATM. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **1**: 179-186.
- Kato, T., R. J. Irwin, Jr. und G. R. Prout, Jr.** 1977. Cell cycles in two cell lines of human bladder carcinoma. *Tohoku J. Exp. Med.* **121**: 157-164.
- Kato, T., K. Ishikawa, R. Nemoto, A. Senoo und Y. Amano.** 1978. Morphological characterization of two established cell lines, T24 and MGH-U1, derived from human urinary bladder carcinoma. *Tohoku J. Exp. Med.* **124**: 339-349.
- Katritch, V., C. Bustamante und W. K. Olson.** 2000. Pulling chromatin fibers: computer simulations of direct physical micromanipulations. *J. Mol. Biol.* **295**: 29-40.
- Kegel, P., E. Riballo, M. Kühne, P. A. Jeggo und M. Löbrich.** 2007. X-irradiation of cells on glass slides has a dose doubling impact. *DNA Repair (Amst.)* **6**:1692-1697.
- Khanna, K. K. und S. P. Jackson.** 2001. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genet.* **27**: 247-254.
- Kiefer, J., R. Egenolf und S. Ikpeme.** 2002. Heavy ion-induced DNA double-strand breaks in yeast. *Radiat. Res.* **157**: 141-148.
- Kraft, G., H. W. Daues, B. Fischer, U. Kopf, H. P. Liebold, D. Quis, H. Stelzer, J. Kiefer, F. Schopfer, E. Schneider, K. Weber, H. Wulf und H. Dertinger.** 1980. Irradiation Chamber and Sample Changer for Biological Samples. *Nuclear Instruments & Methods.* **168**: 175-179.
- Kraft, G. und M. Krämer.** 1993. Linear energy transfer and track structure, p. 1-52. In J. T. Lett and W. K. Sinclair (ed.), *Advances in Radiation Biology*, Vol. **17**. ACADEMIC PRESS, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto.
- Kraxenberger, F., K. J. Weber, A. A. Friedl, F. Eckardt-Schupp, M. Flentje, P. Quicken und A. M. Kellerer.** 1998. DNA double-strand breaks in mammalian cells exposed to gamma-rays and very heavy ions. Fragment-size distributions determined by pulsed-field gel electrophoresis. *Radiat. Environ. Biophys.* **37**: 107-115.
- Kreth, G., J. Finsterle, J. von Hase, M. Cremer und C. Cremer.** 2004. Radial arrangement of chromosome territories in human cell nuclei: a computer model approach based on gene density indicates a probabilistic global positioning code. *Biophys. J.* **86**: 2803-2812.
- Krieger, H. und W. Petzold.** 1992. Strahlenphysik, Dosimetrie und Strahlenschutz. *B.G. Teubner*, Stuttgart.
- Kruhlak, M. J., A. Celeste, G. Dellaire, O. Fernandez-Capetillo, W. G. Müller, J. G. McNally, D. P. Bazett-Jones und A. Nussenzweig.** 2006. Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks. *J. Cell Biol.* **172**: 823-834.

- Kühne, M., K. Rothkamm und M. Löbrich.** 2000. No dose-dependence of DNA double-strand break misrejoining following alpha-particle irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.* **76**: 891-900.
- Kühne, M., E. Riballo, N. Rief, K. Rothkamm, P. A. Jeggo und M. Löbrich.** 2004. A double-strand break repair defect in ATM-deficient cells contributes to radiosensitivity. *Cancer Res.* **64**: 500-508.
- Lammens, M., J. A. Hiel, F. J. Gabreels, B. G. van Engelen, L. P. van den Heuvel und C. M. Weemaes.** 2003. Nijmegen breakage syndrome: a neuropathological study. *Neuropediatrics* **34**: 189-193.
- Lehmann, A. R. und M. G. Ormerod.** 1970. Double-Strand Breaks in Dna of A Mammalian Cell After X-Irradiation. *Biochimica et Biophysica Acta* **217**: 268-277.
- Lehnert, B. E. und E. H. Goodwin.** 1997. Extracellular factor(s) following exposure to alpha particles can cause sister chromatid exchanges in normal human cells. *Cancer Res.* **57**: 2164-2171.
- Little, J. B.** 2006. Cellular radiation effects and the bystander response. *Mutat. Res.* **597**: 113-118.
- Ljungman, M.** 1991. The influence of chromatin structure on the frequency of radiation-induced DNA strand breaks: a study using nuclear and nucleoid monolayers. *Radiat. Res.* **126**: 58-64.
- Löbrich, M., S. Ikpeme und J. Kiefer.** 1993. Analysis of the inversion effect in pulsed field gel electrophoresis by a two-dimensional contour-clamped homogeneous electric field system. *Anal. Biochem.* **208**: 65-73.
- Löbrich, M., B. Rydberg und P. K. Cooper.** 1995. Repair of x-ray-induced DNA double-strand breaks in specific Not I restriction fragments in human fibroblasts: joining of correct and incorrect ends. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 12050-12054.
- Löbrich, M., P. K. Cooper und B. Rydberg.** 1996. Non-random distribution of DNA double-strand breaks induced by particle irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.* **70**: 493-503.
- Löbrich, M.** 1998. Induction and repair of double-strand breaks in human fibroblasts after particle irradiation. *Adv. Space Res.* **22**: 551-560.
- Löbrich, M., N. Rief, M. Kühne, M. Heckmann, J. Fleckenstein, C. Rübe und M. Uder.** 2005. In vivo formation and repair of DNA double-strand breaks after computed tomography examinations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 8984-8989.
- Löbrich, M. und P. A. Jeggo.** 2005a. Harmonising the response to DSBs: a new string in the ATM bow. *DNA Repair* **4**: 749-759.
- Löbrich, M. und P. A. Jeggo.** 2005b. The two edges of the ATM sword: co-operation between repair and checkpoint functions. *Radiother. Oncol.* **76**: 112-118.
- Lorimore, S. A., M. A. Kadhim, D. A. Pocock, D. Papworth, D. L. Stevens, D. T. Goodhead und E. G. Wright.** 1998. Chromosomal instability in the descendants of unirradiated surviving cells after alpha-particle irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 5730-5733.

- Lou, Z. und J. Chen.** 2006. Cellular senescence and DNA repair. *Exp. Cell Res.* **312**: 2641-2646.
- Lowndes, N. F. und G. W. L. Toh.** 2005. DNA repair: The importance of phosphorylating histone H2AX. *Current Biol.* **15**: R99-R102.
- Lu, Q., L. L. Wallrath und S. C. Elgin.** 1994. Nucleosome positioning and gene regulation. *J. Cell Biochem.* **55**: 83-92.
- Manuelidis, L. und T. L. Chen.** 1990. A Unified Model of Eukaryotic Chromosomes. *Cytometry* **11**: 8-25.
- Maser, R. S., R. Zinkel und J. H. Petrini.** 2001. An alternative mode of translation permits production of a variant NBS1 protein from the common Nijmegen breakage syndrome allele. *Nature Genet.* **27**: 417-421.
- McClintock, B.** 1931. Cytological observations of deficiencies in *Zea mays*. *Agric. Exp. Station Res. Bull.* **163**: 1-30.
- Mirkovitch, J., M. E. Mirault und U. K. Laemmli.** 1984. Organization of the higher-order chromatin loop: specific DNA attachment sites on nuclear scaffold. *Cell* **39**: 223-232.
- Mitra, A. K. und M. Krishna.** 2007. Radiation-induced bystander effect: activation of signaling molecules in K562 erythroleukemia cells 3 20. *J. Cell Biochem.* **100**: 991-997.
- Montroll, E. W. und R. Simha.** 1940. Theory of depolymerization of long chain molecules. *J. Chem. Phys.* **8**: 721-727.
- Morgan, W. F.** 2003a. Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: I. Radiation-induced genomic instability and bystander effects in vitro. *Radiat. Res.* **159**: 567-580.
- Morgan, W. F.** 2003b. Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: II. Radiation-induced genomic instability and bystander effects in vivo, clastogenic factors and transgenerational effects. *Radiat. Res.* **159**: 581-596.
- Morgan, W. F. und M. B. Sowa.** 2007. Non-targeted bystander effects induced by ionizing radiation. *Mutat. Res.* **616**: 159-164.
- Mothersill, C. und C. Seymour.** 1997. Medium from irradiated human epithelial cells but not human fibroblasts reduces the clonogenic survival of unirradiated cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **71**: 421-427.
- Mothersill, C. und C. Seymour.** 2005. Radiation-induced bystander effects: are they good, bad or both? *Med. Confl. Surviv.* **21**: 101-110.
- Mothersill, C. und C. Seymour.** 2006. Radiation-induced bystander and other non-targeted effects: novel intervention points in cancer therapy? *Curr. Cancer Drug Targets* **6**: 447-454.
- Müller, H. J.** 1927. Artificial transmutation of the gene. *Science* **66**: 84-87.

- Müller, W. G., D. Rieder, G. Kreth, C. Cremer, Z. Trajanoski und J. G. McNally.** 2004. Generic features of tertiary chromatin structure as detected in natural chromosomes. *Mol. Cell Biol.* **24**: 9359-9370.
- Münkel, C. und J. Langowski.** 1998. Chromosom structure discribed by a polymer model. *Phys. Rev. sect. E* **57**: 5896.
- Münkel, C., R. Eils, S. Dietzel, D. Zink, C. Mehring, G. Wedemann, T. Cremer und J. Langowski.** 1999. Compartmentalization of interphase chromosomes observed in simulation and experiment. *J. Mol. Biol.* **285**: 1053-1065.
- Muroya, Y., I. Plante, E. I. Azzam, J. Meesungnoen, Y. Katsumura und J. P. Jay-Gerin.** 2006. High-LET ion radiolysis of water: visualization of the formation and evolution of ion tracks and relevance to the radiation-induced bystander effect. *Radiat. Res.* **165**: 485-491.
- Newman, H. C., K. M. Prise und B. D. Michael.** 2000. The role of higher-order chromatin structure in the yield and distribution of DNA double-strand breaks in cells irradiated with X- rays or alpha-particles. *Int. J. Radiat. Biol.* **76**: 1085-1093.
- Nikjoo, H., P. O'Neill, D. T. Goodhead und M. Terrissol.** 1997. Computational modelling of low-energy electron-induced DNA damage by early physical and chemical events. *Int. J. Radiat. Biol.* **71**: 467-483.
- Nussenzweig, A. und T. Paull.** 2006. DNA repair: tails of histones lost. *Nature.* **439**: 406-407.
- Ostashevsky, J. Y. und C. S. Lange.** 1994. The 30 nm chromatin fiber as a flexible polymer. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **11**: 813-820.
- Ostashevsky, J.** 1998. A polymer model for the structural organization of chromatin loops and minibands in interphase chromosomes. *Mol. Biol. Cell* **9**: 3031-3040.
- Ostashevsky, J. Y.** 2000. Higher-order structure of interphase chromosomes and radiation-induced chromosomal exchange aberrations. *Int. J. Radiat. Biol.* **76**: 1179-1187.
- Österreicher, J., K. M. Prise, B. D. Michael, J. Vogt, T. Butz und J. M. Tanner.** 2003. Radiation-induced bystander effects. Mechanisms, biological implications, and current investigations at the Leipzig LIPSION facility. *Strahlenther. Onkol.* **179**: 69-77.
- Ottolenghi, A., M. Merzagora und H. G. Paretzke.** 1997. DNA complex lesions induced by protons and alpha-particles: track structure characteristics determining linear energy transfer and particle type dependence. *Radiat. Environ. Biophys.* **36**: 97-103.
- Paulson, J. R. und U. K. Laemmli.** 1977. Structure of Histone-Depleted Metaphase Chromosomes. *Cell* **12**: 817-828.
- Pinto, M., H. C. Newman, K. M. Prise und B. D. Michael.** 2000. Quantification of DNA damage by PFGE: development of an analytical approach to correct for the background distribution. *Int. J. Radiat. Biol.* **76**: 741-748.
- Pinto, M., K. M. Prise und B. D. Michael.** 2002. Quantification of radiation induced DNA double-strand breaks in human fibroblasts by PFGE: testing the applicability of random breakage models. *Int. J. Radiat. Biol.* **78**: 375-388.

- Pinto, M., K. M. Prise und B. D. Michael.** 2004. A Monte Carlo model of DNA double-strand break clustering and rejoining kinetics for the analysis of pulsed-field gel electrophoresis data. *Radiat. Res.* **162**: 453-463.
- Pinto, M., K. M. Prise und B. D. Michael.** 2005. Evidence for complexity at the nanometer scale of radiation-induced DNA DSBs as a determinant of rejoining kinetics. *Radiat. Res.* **164**: 73-85.
- Preston, R. J.** 2005a. Radiation biology: concepts for radiation protection. *Health Phys.* **88**: 545-556.
- Preston, R. J.** 2005b. Bystander effects, genomic instability, adaptive response, and cancer risk assessment for radiation and chemical exposures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **207**: 550-556.
- Prise, K. M., M. Pinto, H. C. Newman und B. D. Michael.** 2001. A review of studies of ionizing radiation-induced double-strand break clustering. *Radiat. Res.* **156**: 572-576.
- Prise, K. M., M. Folkard und B. D. Michael.** 2003. Bystander responses induced by low LET radiation. *Oncogene* **22**: 7043-7049.
- Prise, K. M., M. Folkard, V. Kuosaite, L. Tartier, N. Zyuzikov und C. Shao.** 2006. What role for DNA damage and repair in the bystander response? *Mutat. Res.* **597**: 1-4.
- Pross, H. D.** Untersuchungen zur Abschätzung des Strahlenrisikos im Weltraum: Genetische Wirkung schwerer geladener Teilchen und Einflüsse der Mikrogravitation auf das Reparaturverhalten, JLU - Gießen 1997.
- Radford, I. R. und G. S. Hodgson.** 1985. I-125-Induced Dna Double Strand Breaks - Use in Calibration of the Neutral Filter Elution Technique and Comparison with X-Ray-Induced Breaks. *Int. J. Radiat. Biol.* **48**: 555-566.
- Radulescu, I., K. Elmroth und B. Stenerlöv.** 2004. Chromatin organization contributes to non-randomly distributed double-strand breaks after exposure to high-LET radiation. *Radiat. Res.* **161**: 1-8.
- Riballo, E., M. Kühne, N. Rief, A. Doherty, G. C. Smith, M. J. Recio, C. Reis, K. Dahm, A. Fricke, A. Krempler, A. R. Parker, S. P. Jackson, A. Gennery, P. A. Jeggo und M. Löbrich.** 2004. A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci. *Mol. Cell.* **16**: 715-724.
- Rich, T., R. L. Allen und A. H. Wyllie.** 2000. Defying death after DNA damage. *Nature.* **407**: 777-783.
- Richardson, C. und M. Jasin.** 2000. Coupled homologous and nonhomologous repair of a double-strand break preserves genomic integrity in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* **20**: 9068-9075.
- Rief, N. und M. Löbrich.** 2002. Efficient rejoining of radiation-induced DNA double-strand breaks in centromeric DNA of human cells. *J. Biol. Chem.* **277**: 20572-20582.
- Ritter, M. A., J. E. Cleaver und C. A. Tobias.** 1977. High-Let Radiations Induce A Large Proportion of Non-Rejoining DNA Breaks. *Nature.* **266**: 653-655.

- Rodrigue, A., M. Lafrance, M. C. Gauthier, D. McDonald, M. Hendzel, S. C. West, M. Jasin und J. Y. Masson.** 2006. Interplay between human DNA repair proteins at a unique double-strand break in vivo. *EMBO J.* **25**: 222-231.
- Rogakou, E. P., D. R. Pilch, A. H. Orr, V. S. Ivanova und W. M. Bonner.** 1998. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* **273**: 5858-5868.
- Rogakou, E. P., C. Boon, C. Redon und W. M. Bonner.** 1999. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J. Cell Biol.* **146**: 905-916.
- Rogakou, E. P., W. Nieves-Neira, C. Boon, Y. Pommier und W. M. Bonner.** 2000. Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J. Biol. Chem.* **275**: 9390-9395.
- Roots, R. und S. Okada.** 1972. Protection of Dna Molecules of Cultured Mammalian-Cells from Radiation-Induced Single-Strand Scissions by Various Alcohols and Sh Compounds. *Int. J. Radiat. Biol. and Rel. Stud. Phys. Chem. and Med.* **21**: 329-&.
- Roots, R., A. Chatterjee, E. Blakely, P. Chang, K. Smith and C. Tobias.** 1982. Radiation responses in air-, nitrous oxide-, and nitrogen-saturated mammalian cells. *Radiat. Res.* **92**: 245-254.
- Rose, K., J. O. Mason und R. Lathe.** 2002. Hybridization parameters revisited: solutions containing SDS. *Biotechniques* **33**: 54-6, 58.
- Rothkamm, K. und M. Löbrich.** 1999. Misrejoining of DNA double-strand breaks in primary and transformed human and rodent cells: a comparison between the HPRT region and other genomic locations. *Mutat. Res.* **433**: 193-205.
- Rothkamm, K., M. Kühne, P. A. Jeggo und M. Löbrich.** 2001. Radiation-induced genomic rearrangements formed by nonhomologous end-joining of DNA double-strand breaks. *Cancer Res.* **61**: 3886-3893.
- Rothkamm, K., I. Krüger, L. H. Thompson, und M. Löbrich.** 2003. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol. Cell Biol.* **23**: 5706-5715.
- Rothkamm, K. und M. Löbrich.** 2003. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 5057-5062.
- Roti, J. L. R., W. D. Wright und Y. C. Taylor.** 1993. DNA loop structure and radiation response_, p. 227-259. In J. T. Lett and W. K. Sinclair (ed.), *Advances in Radiation Biology*, vol. 17. *ACADEMIC PRESS*, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto.
- Rydberg, B., M. Löbrich und P. K. Cooper.** 1994. DNA double-strand breaks induced by high-energy neon and iron ions in human fibroblasts. I. Pulsed-field gel electrophoresis method. *Radiat. Res.* **139**: 133-141.
- Rydberg, B.** 1996. Clusters of DNA damage induced by ionizing radiation: formation of short DNA fragments. II. Experimental detection. *Radiat. Res.* **145**: 200-209.

- Rydberg, B., W. R. Holley, I. S. Mian und A. Chatterjee.** 1998a. Chromatin conformation in living cells: support for a zig-zag model of the 30 nm chromatin fiber. *J. Mol. Biol.* **284**: 71-84.
- Rydberg, B., M. Löbrich und P. K. Cooper.** 1998b. Repair of clustered DNA damage caused by high LET radiation in human fibroblasts. *Heavy Charged Particles in Biology and Medicine.* **14**(1): 24-28.
- Rydberg, B.** 2001. Radiation-induced DNA Damage and Chromatin Structure. *Acta Oncol.* **40**: 682-685.
- Rydberg, B., L. Heilbronn, W. R. Holley, M. Löbrich, C. Zeitlin, A. Chatterjee und P. K. Cooper.** 2002. Spatial distribution and yield of DNA double-strand breaks induced by 3- 7 MeV helium ions in human fibroblasts. *Radiat. Res.* **158**: 32-42.
- Sachs, R. K., E. G. van den, B. Trask, H. Yokota und J. E. Hearst.** 1995. A random-walk/giant-loop model for interphase chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 2710-2714.
- Sambrook, J. und D. W. Russell.** 2001. Molecular Cloning a Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor; New York.
- Savitsky, K., A. Bar-Shira, S. Gilad, G. Rotman, Y. Ziv, L. Vanagaite, D. A. Tagle, S. Smith, T. Uziel, S. Sfez, M. Ashkenazi, I. Pecker, M. Frydman, R. Harnik, S. R. Patanjali, A. Simmons, G. A. Clines, A. Sartiel, R. A. Gatti, L. Chessa, O. Sanal, M. F. Lavin, N. G. Jaspers, A. M. Taylor, C. F. Arlett, T. Miki, S. M. Weissman, M. Lovett, F. S. Collins und Y. Shiloh.** 1995a. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* **268**: 1749-1753.
- Savitsky, K., S. Sfez, D. A. Tagle, Y. Ziv, A. Sartiel, F. S. Collins, Y. Shiloh und G. Rotman.** 1995b. The complete sequence of the coding region of the ATM gene reveals similarity to cell cycle regulators in different species. *Hum. Mol. Genet.* **4**: 2025-2032.
- Sax, K.** 1939. The time factor in X-ray production of chromosomal aberration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **25**: 225-233.
- Schiessel, H., W. M. Gelbart und R. Bruinsma.** 2001. DNA folding: structural and mechanical properties of the two-angle model for chromatin. *Biophys. J.* **80**: 1940-1956.
- Schmidt-Bocking, H., U. Ramm, G. Kraft, J. Ullrich, H. Berg, C. Kelbch, R. E. Olson, R. DuBois, S. Hagmann und F. Jiazhen.** 1992. Delta-electron emission in fast heavy ion atom collisions. *Adv. Space Res.* **12**: 7-15.
- Sedelnikova, O. A., A. Nakamura, O. Kovalchuk, I. Koturbash, S. A. Mitchell, S. A. Marino, D. J. Brenner und W. M. Bonner.** 2007. DNA double-strand breaks form in bystander cells after microbeam irradiation of three-dimensional human tissue models. *Cancer Res.* **67**: 4295-4302.
- Severin, E., H. L. Kronholz, W. Kohnlein und W. Gohde.** 2005. Dosimetry of soft x-rays in thin liquid layers. *Physics in Med. and Biol.* **50**: 1459-1467.

- Seymour, C. B. und C. Mothersill.** 2000. Relative contribution of bystander and targeted cell killing to the low-dose region of the radiation dose-response curve. *Radiat. Res.* **153**: 508-511.
- Shankar, B., R. Pandey und K. Sainis.** 2006. Radiation-induced bystander effects and adaptive response in murine lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* **82**: 537-548.
- Shroff, R., A. Arbel-Eden, D. Pilch, G. Ira, W. M. Bonner, J. H. Petrini, J. E. Haber und M. Lichten.** 2004. Distribution and dynamics of chromatin modification induced by a defined DNA double-strand break. *Curr. Biol.* **14**: 1703-1711.
- Simpson, R. T.** 1991. Nucleosome positioning: occurrence, mechanisms, and functional consequences. *Prog. Nucleic Acid Mol. Biol.* **40**: 143-184.
- Smerdon, M. J. und F. Thoma.** 1990. Site-specific DNA repair at the nucleosome level in a yeast minichromosome. *Cell* **61**: 675-684.
- Snustad, D. P. und M. J. Simmons.** 1999. Principles of Genetics. *John Wiley & Sons, Inc.*, New York; Chichester; Weinheim; Brisbane; Singapore; Toronto.
- Sokolov, M. V., L. B. Smilenov, E. J. Hall, I. G. Panyutin, W. M. Bonner, und O. A. Sedelnikova.** 2005. Ionizing radiation induces DNA double-strand breaks in bystander primary human fibroblasts. *Oncogene* **24**: 7257-7265.
- Stenerlöw, B. und E. Höglund.** 2002. Rejoining of double-stranded DNA-fragments studied in different size- intervals. *Int. J. Radiat. Biol.* **78**: 1-7.
- Stenerlöw, B., E. Höglund und J. Carlsson.** 1999. Induction and rejoining of large DNA fragments after ion irradiation. *Radiat. Res.* **151**: 642-648.
- Stenerlöw, B., E. Höglund, J. Carlsson und E. Blomquist.** 2000. Rejoining of DNA fragments produced by radiations of different linear energy transfer. *Int. J. Radiat. Biol.* **76**: 549-557.
- Stenerlöw, B.** 2006. Radiation-induced bystander effects. *Acta Oncol.* **45**: 373-374.
- Stewart, R. D.** 2001. Two-lesion kinetic model of double-strand break rejoining and cell killing. *Radiat. Res.* **156**: 365-378.
- Stiff, T., C. Reis, G. K. Alderton, L. Woodbine, M. O'Driscoll und P. A. Jeggo.** 2005. Nbs1 is required for ATR-dependent phosphorylation events. *EMBO J.* **24**: 199-208.
- Tamayo, J.** 2003. Structure of human chromosomes studied by atomic force microscopy. *J. Struct. Biol.* **141**: 198-207.
- Taucher-Scholz, G., J. Heilmann und G. Kraft.** 1996. Induction and rejoining of DNA double-strand breaks in CHO cells after heavy ion irradiation. *Adv. Space Res.* **18**: 83-92.
- Tseng, S. und J. P. Hsu.** 1990. A kinetic analysis of the repair of radiation-induced DNA double-strand breaks. *Radiat. Res.* **122**: 333-336.
- Tsukamoto, T., N. Hashiguchi, S. M. Janicki, T. Tumber, A. S. Belmont und D. L. Spector.** 2000. Visualization of gene activity in living cells. *Nature Cell Biol.* **2**: 871-878.

- Tumbar, T., G. Sudlow und A. S. Belmont.** 1999. Large-scale chromatin unfolding and remodeling induced by VP16 acidic activation domain. *J. Cell Biol.* **145**: 1341-1354.
- Vamvakas, S., E. H. Vock und W. K. Lutz.** 1997. On the role of DNA double-strand breaks in toxicity and carcinogenesis. *Crit. Rev. Toxicol.* **27**: 155-174.
- van Gent, D. C., J. H. Hoeijmakers und R. Kanaar.** 2001. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nature Rev. Genet.* **2**: 196-206.
- van Holde, K. und J. Zlatanova.** 1995. Chromatin Higher-Order Structure - Chasing A Mirage. *J. Biol. Chem.* **270**: 8373-8376.
- Vardevanyan, P. O., A. P. Antonyan, G. A. Manukyan und A. T. Karapetyan.** 2001. Study of ethidium bromide interaction peculiarities with DNA. *Exp. Mol. Med.* **33**: 205-208.
- Vardevanyan, P. O., A. P. Antonyan, M. A. Parsadanyan, H. G. Davtyan und A. T. Karapetyan.** 2003. The binding of ethidium bromide with DNA: interaction with single- and double-stranded structures. *Exp. Mol. Med.* **35**: 527-533.
- Ward, J. F., W. F. Blakely und E. I. Joner.** 1985. Mammalian-Cells Are Not Killed by Dna Single-Strand Breaks Caused by Hydroxyl Radicals from Hydrogen-Peroxide. *Radiat. Res.* **103**: 383-392.
- Ward, J. F.** 1988. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **35**: 95-125.
- Ward, J. F.** 1995. Radiation Mutagenesis - the Initial DNA Lesions Responsible (Vol 142, Pg 362, 1995). *Radiat. Res.* **143**: 355.
- Ward, J. F.** 1998. Nature of lesions formed by ionizing radiation. In DNA Damage and Repair, Vol. 2. J. A. Nickoloff and M. F. Hoeckstra, eds. Humana Press.
- Watson, J. D. und F. H. C. Crick.** 1953. Molecular Structure of Nucleic Acids - A Structure for Deoxyribose. *Nucleic Acid. Res.* **171**: 737-738.
- Wheeler, K. T. und G. B. Nelson.** 1991. Saturation of DNA repair measured by alkaline elution. *Radiat. Res.* **125**: 227-229.
- White, C. L., R. K. Suto und K. Luger.** 2001. Structure of the yeast nucleosome core particle reveals fundamental changes in internucleosome interactions. *EMBO J.* **20**: 5207-5218.
- Widom, J.** 1998. Structure, dynamics, and function of chromatin in vitro. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**: 285-327.
- Wolffe, A. P. und D. Guschin.** 2000. Review: chromatin structural features and targets that regulate transcription. *J. Struct. Biol.* **129**: 102-122.
- Wood, R. D., M. Mitchell, J. Sgouros und T. Lindahl.** 2001. Human DNA repair genes. *Science* **291**: 1284-1289.
- Woodcock, C. L. und S. Dimitrov.** 2001. Higher-order structure of chromatin and chromosomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**: 130-135.

- Woodcock, C. L., S. A. Grigoryev, R. A. Horowitz und N. Whitaker.** 1993. A Chromatin Folding Model That Incorporates Linker Variability Generates Fibers Resembling the Native Structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 9021-9025.
- Wu, L. J., G. Randers-Pehrson, A. Xu, C. A. Waldren, C. R. Geard, Z. L. Yu und T. K. Hei.** 1999. Targeted cytoplasmic irradiation with alpha particles induces mutations in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 4959-4964.
- Yang, H. Y., N. Asaad und K. D. Held.** 2005. Medium-mediated intercellular communication is involved in bystander responses of X-ray-irradiated normal human fibroblasts. *Oncogene* **24**: 2096-2103.
- Yokota, H., E. G. van den, J. E. Hearst, R. K. Sachs und B. J. Trask.** 1995. Evidence for the organization of chromatin in megabase pair-sized loops arranged along a random walk path in the human G0/G1 interphase nucleus. *J. Cell Biol.* **130**: 1239-1249.
- Zhou, H., G. Randers-Pehrson, C. A. Waldren, D. Vannais, E. J. Hall und T. K. Hei.** 2000. Induction of a bystander mutagenic effect of alpha particles in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 2099-2104.
- Zlatanova, J. und S. H. Leuba.** 2003. Chromatin fibers, one-at-a-time. *J. Mol. Biol.* **331**: 1-19.

Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

1. Scientific Reports:

- Fricke, A., M. Kühne und M. Löbrich.** 2001. Non-random distribution of double-stranded DNA fragments generated by highly ionizing beams. *GSI. scientific report 2002-1*. 158.
- Fricke, A., M. Kühne, K. Rothkamm und M. Löbrich.** 2002. DNA fragment distributions generated by high-LET particles. *GSI. Scientific report 2003-1*. 156.
- Fricke, A., und M. Löbrich.** 2003. Inter-track and intra-track DNA fragment distributions in dependence of radiation quality, particle fluence and LET. *GSI. Scientific report 2004-1*. 160.
- Fricke, A., M. Kühne und M. Löbrich.** 2004 Quantitative analysis of DNA fragment distributions generated by densely ionising radiation. GSI. Scientific report 2005-1, RADBIOPH-05.
- Fricke, A., M. Kühne und M. Löbrich.** 2005 Repair of high-LET induced DSBs *GSI. Scientific report 2006-1*. RADBIOPH-04: 166.

2. Tagungsbeiträge:

- Fricke, A., M. Kühne und M. Löbrich.** 2002. The influence of chromatin structure on the induction of double-stranded DNA fragments generated by densely ionizing radiation. Gesellschaft für biologische Strahlenforschung e.V. (GBS) 2002.
- Fricke, A. und M. Löbrich.** 2004. Influence of radiation quality and higher-order chromatin structure on double-stranded DNA fragmentation. Gesellschaft für biologische Strahlenforschung e.V. (GBS) 2004.
- Fricke, A. und M. Löbrich.** 2005. Qualitative und quantitative Analyse doppelsträngiger DNA-Fragmente nach dicht ionisierender Strahlung. Gesellschaft für biologische Strahlenforschung e.V. (GBS) 2005.

Lebenslauf

Personelle Daten:

Name: Andreas Fricke
Wohnort: Tiergartenstr. 45
66424 Homburg

Geburtsdatum: 05.10.1975
Geburtsort: Lichtenstein/Sa.
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Akademische und schulische Ausbildung:

09/1982 – 05/1990 Grundschule

09/1990 – 07/1994 Gymnasium „Prof-Dr-Max-Schneider“, Lichtenstein
Abschluss mit allgemeiner Hochschulreife

10/1995 – 10/2000 Studium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Abschluss als Diplom-Biologe

Beruflicher Werdegang:

09/1999 – 10/2000 Diplomarbeit an der FSU Jena
Arbeitsgruppe „Molekulare und Zelluläre Biophysik“
Thema der Diplomarbeit: „Regulation von Kaliumkanälen durch tierische und pflanzliche $K_v\beta$ -Untereinheiten“

12/2000 – 12/2004 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität des Saarlandes
Fachrichtung Biophysik, Arbeitsgruppe Prof. Dr. M. Löbrich

01/2005 – 06/2005 Arbeit suchend

07/2005 – 12/2005 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität des Saarlandes
Fachrichtung Biophysik, Arbeitsgruppe Prof. Dr. M. Löbrich

01/2006 – 12/2007 Arbeit suchend

seit 01/2008 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität des Saarlandes
Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie unter Prof. Dr. Ch. Rübe

Eidesstattliche Erklärung

Hierdurch erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Homburg, den 18.02.2008